



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ERİTROSİTLERDE SİSTEİN TRANSPORTUNA AZASERİN'İN ETKİSİ

MUHARREM ATLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Antakya/ HATAY
AĞUSTOS - 2007**

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ERİTROSİTLERDE SİSTEİN TRANSPORTUNA AZASERİN'İN ETKİSİ

Muharrem ATLI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Doç. Dr. Deniz YILDIZ ve Prof.Dr. Haydar ÖZTAŞ'ın danışmanlığında hazırlanan bu tez 13/ 08 /2007 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

İmza

Doç. Dr Deniz YILDIZ

İmza

Prof. Dr. Haydar ÖZTAŞ

İmza

Doç. Dr. Suat ERDOĞAN

İmza

Yrd. Doç. Dr. Erol ATAY

İmza

Yrd. Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Necat AĞCA

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirislerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Azaserin	5
2.2. L-Sistein ve Hücresel Önemi.....	9
2.3. Glutatyon	13
2.3.1. Hücre içi Antioksidan Olarak Glutatyon Sentezi ve Önemi.....	15
2.4. L-Glutamin	16
2.5. Süperoksit Oluşumu ve Antioksidan Savunma Arasındaki İlişki.....	18
2.6. Hücre Membranı ve Transport Sistemleri.....	21
2.6.1.Eritrositlerin Membran Yapısı ve Fonksiyonları.....	24
2.7. Memeli Hücrelerinde Amino Asit Transport Sistemleri.....	26
2.7.1. Zwitteriyonik Amino Asitler için Genel Transport Sistemleri.....	26
2.7.2. Katyonik Amino Asit Transport Sistemleri.....	28
2.7.3. Anyonik Amino Asit Transport Sistemleri.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. İstatistiksel Analizler.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	40
5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	53
TEŞEKKÜR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÖZET

ERİTROSİTLERDE SİSTEİN TRANSPORTUNA AZASERİN'İN ETKİSİ

Bu çalışmanın amacı, insan eritrositlerinde sistein giriş ve çıkışı üzerine azaserinin etkisinin araştırılmasıdır. Azaserin, güçlü bir kanserojendir ve özellikle pankreasta tümör oluşumuna neden olmaktadır. Glutamin kullanan enzimleri inhibe ettiği ve böylece hücrelerde *de nova* pürin sentezini karıştırdığı bilinmektedir. Azaserin hücrelerin DNA'sında hasara neden olmakta olup, bu etkisi çoğunlukla tümör oluşumuna katılıcı özeliği olarak kabul edilmektedir. Azaserin bazı dokularda tümör meydana getirirken bazı dokularda tümör meydana getirmemesine ancak bu dokularda tümör meydana getirmesinde başka faktörlerde rol oynayabilir.

Azaserin yapısal olarak glutamine benzer ve bu nedenle enzim aktiviteleri ve maddelerin membran transportu dahil birçok biyolojik olayda rol alır. Glutamin ve sistein benzer bir transport paylaşım mekanizması gösterir. Buna nedenle; bir glutamin analogu olan azaserin, hücre membranından sistein transportunu etkileyebilir veya tam aksine sistein varlığı hücrelerden azaserinin girişini ya da çıkışını etkileyebilir. Bu çalışmada eritrositler, azaserin ve sisteinin farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilerek daha sonra zardan sistein giriş ve çıkışı ölçüldü. Çalışmalarımız, azaserinin eritrosit membranlarının çift yönlü sistein transportu üzerinde bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Azaserin varlığında ve yokluğunda (1.9 ± 0.14 $\mu\text{mol/ml/eritrosit}$) hücrelere sistein girişi karşılaştırıldığında 2 mM (2.4 ± 0.07 $\mu\text{mol/ml/eritrosit}$) azaserin varlığında küçük bir miktarda sistein girişinin olduğu tespit edilmiştir. Glutaminin sistein transportu üzerine olan etkisi de benzer olarak değerlendirilmiştir. Eritrositlerden sistein çıkışında azaserin daha etkili olup, bu artış azaserinin 0.5 mM konsantrasyonuyla başlamakta ve konsantrasyona bağlı olarak artış göstermektedir. Eritrositlerden sistein çıkış oranı 2 mM azaserin varlığında 0.71 ± 0.05 $\mu\text{mol/ml/eritrosit}$ iken azaserin yokluğunda 0.51 ± 0.01 $\mu\text{mol/ml/eritrosit}$ dir. Elde edilen bulgular azaserinin, azaserin/sistein değişimi mekanizmaları aracılığıyla eritrositlere girebildiğini göstermekte olup, glutamin azaserinle yapısal olarak benzerlik gösterse de sistein girişi üzerinde herhangi bir etki meydana getirmediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte 2 mM glutamin eritrositlerden sistein çıkışını önemli derecede artırmıştır.

Bulgular kanserojen bir madde olan azaserinin eritrosit membranlarında sistein değişim mekanizmalarını etkilediğini göstermekte olup, azaserinin meydana getirdiği DNA hasarı ve enzim faaliyetleri üzerindeki etkilerine ek olarak azaserinin tanımlanan bu mekanizmalar ile kanser oluşumuna neden olabileceği ileri sürülebilir. Azaserin sistein değişim mekanizmalarıyla hücrelere girişi artırırken sistein varlığını sınırlandırabilir. Buda azaserinin dokularda birikmesinde ve tümör oluşumunda etkin olabilir.

2007, 59 Sayfa

Anahtar kelimeler: Azaserin, Karsinogeneti, Sistein transportu

ABSTRACT

THE EFFECTS OF AZASERINE ON CYSTEINE TRANSPORT IN ERYTHROCYTES

The objective of the present study was to investigate the effect of azaserine on cysteine influx and efflux in human erythrocytes. Azaserine is a potent carcinogen and it induces tumors especially in pancreas. Azaserine is known to inhibit glutamine utilizing enzymes and thus interfere with the *de nova* purine synthesis in cells. It also induces DNA damages. These effect of azaserine is readily accepted as contributors to its carcinogenicity. However, subsequent induction of tumors by azaserine only in specific tissues and unresponsiveness of other tissues to azaserine suggest that other factors may also play a role in azaserine induced carcinogenesis. Azaserine structurally resembles glutamine and thus interferes with a variety biological processes including enzymatic activities and transmembrane transport of solutes. Glutamine and cysteine have been shown to share similar transport mechanisms. In this respect azaserine, being a glutamine analog, may effect the cysteine transport across the cell membrane or conversely cysteine availability may effect the uptake or release of azaserine. In the present study human erythrocytes were treated with different concentrations of azaserine and cysteine and then the influx and efflux of cysteine were measured. The effect of glutamine on cysteine transport was also measured in a similar way. Our results indicate that azaserine has an effect on bi-directional transport of cysteine through the erythrocyte membranes. A slight induction of cysteine influx was observed in the presence of 2 mM of azaserine ($2.4 \pm 0.07 \mu\text{mol/ml/erythrocyte}$) compared to the absence of azaserine ($1.9 \pm 0.14 \mu\text{mol/ml/erythrocyte}$). However, the effect of azaserine on cysteine efflux from erythrocytes was more pronounced and started at 0.5 mM of azaserine and then increased in a concentration dependent manner. In the presence of 2 mM of azaserine the cysteine efflux rate was $0.71 \pm 0.05 \mu\text{mol/ml/erythrocyte}$ and in the absence of azaserine the efflux rate was $0.51 \pm 0.01 \mu\text{mol/ml/erythrocyte}$. This result suggest; that azaserine may enter in to erythrocytes by an azaserine /cysteine exchange mechanism. Glutamin did not show any effect on cysteine influx. However, 2 mM of glutamine also significantly increased the cysteine efflux from erythrocytes. Our result suggest that carcinogenic compound azaserine effects the flux of cysteine through erythrocyte membranes. We suggest that in addition to its effect on induction of DNA damages and enzymatic activities azaserine may contribute to its carcinogenicity by effective cystein transport Azaserine may limit the cysteine availability as it gains into the cells in exchange with cysteine. This may also represent a mechanism by which azaserine is accumulated in tissues in which it causes carcinogenesis.

2007, 59 Pages

Key words: Azaserine, Carcinogenicity, Cysteine transport

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AACN	Atipik asinar hücre nodülü
ASC	Alanin, Serin, Sistein taşıma sistemi
ATP	Adenozin trifosfat
DTNB	5,5'-dithiobis (-nitrobenzoate)
DNA	Deoksiribonükleik asit
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
ETDA	Etilendiamin tetraasit
GABA	Gammaaminobutirik asit
GSSG	Okside glutatyon
GSH	Redükte glutatyon
GGT	γ -glutamil transpeptidaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
MRP	Multi Drug-Resistance Protein
NAC	N-Asetil-L-sistein
NAD	Nikotinadenin dinükleotid
NO	Nitrik Oksit
PKMBA	Parakloromerkuribenzoik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikloroasetikasit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil.1.1. L-glutamin ve L-azaserinin Kimyasal Yapısı.....	8
Şekil.1.2. L-sistein'in Genel Yapısı ve Sentezi.....	10
Şekil.1.3. L-sistein Katabolizması.....	12
Şekil.1.4. Glutasyon'un Kimyasal Yapısı.....	14
Şekil.1.5. Glutasyon Sentezi.....	17
Şekil.1.6. Moleküler Oksijenden Ara Ürünlerin Oluşumu.....	20
Şekil.1.7. Antioksidan Enzim Aktiviteleri.....	20
Şekil.4.1. Eritrositler Tarafından Sistein Alınımı.....	42
Şekil.4.2. Eritrositlerden Sistein çıkışı.....	43
Şekil.4.3. Sistein Girişine Azaserin'in Etkisi.....	44
Şekil.4.4. Sistein Çıkışına Azaserin'in Etkisi.....	45
Şekil.4.5. Sistein Girişine Azaserinin Geri Dönüşümlü Etkisi.....	46
Şekil.4.6. Sistein Girişine Glutamin'in Etkisi.....	47
Şekil.4.7. Sistein Çıkışına Glutamin'in Etkisi.....	48

1. GİRİŞ

Sistein, hücre içinde metiyonin ve serin amino asitlerinden sentezlenen esansiyel olmayan bir amino asittir (Kalra ve ark.,1981). Diğer bir hücre içi sistein kaynağında sistin olup, hücre dışı alandan alınan sistin, hücrede iki molekül sisteine indirgenir (Mcbean ve Flynn., 2001). Hücreler tarafından elde edilen sistein, proteinlerin biosentez öncülü olarak kullanılmakta olup, bu yüzden hücreler tarafından ihtiyaç duyulmaktadır. Sistein sadece protein sentezine katılmakla kalmaz aynı zamanda hücreler için önemli bir tripeptid olan glutatyon (GSH) sentezine de katılır (Griffith, 1999). GSH doku ve hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan antioksidant olarak görev yapar (Sies, 1999). Ayrıca çeşitli ksenobiotiklerin hücresel detoksifikasyonunda da rol oynar. Bu reaksiyonlar çoğunlukla glutatyon S-transferaz enzimi tarafından katalizlenen konjugasyon reaksiyonlarını içerir (Eckert ve Eyer., 1986). Bu reaksiyonlarda, sistein reaktif bir sülfid grubu sağlayıcısı ve GSH'ın fonksiyonel grubu olarak davranır. Sistein GSH sentezine katılmakla kalmaz aynı zamanda N-Asetil-L-sistein olarak kullanıldığında serbest radikallere karşı antioksidan olarak işlev görür (Vries ve Flora., 1993). Sistein, genel olarak hücre içi ve hücre dışı redoks durumun bütünlüğünün sağlanması amacıyla görev yapar. Bu etkilerine ilaveten sisteinin kanser oluşumunda rol oynadığı tespit edilmiştir. Plazma sistein konsantrasyonunun meme kanseri oluşumuyla ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2003). Bu nedenle sistein varlığı kanser gelişiminde rol oynayabilir.

Azaserin (O-diazoasetil-L-serin) toksik ve kanserojenik bir bileşik olup, ilk defa *Streptomyces* mantar kültürlerinden izole edilmiştir (Bartz ve ark., 1954). Başlangıçta azaserin antibiyotik ve antineoplastik madde olarak kullanılmıştır (Coffey ve ark., 1954; Stock ve ark., 1954). Daha sonra azaserinin güçlü bir tümör meydana getirici madde olduğu keşfedilmiştir. Sıçanlara 12 ve 18 ay boyunca haftada bir doz azaserin enjekte edildiğinde sıçanların pankreaslarında azaserinin tümör oluşturduğu tespit edilmiştir (Longnecker ve Curpey., 1975). Yapılan çalışmalar sonucunda; azaserinin pankreastan başka dokularda da kanser oluşumuna neden olduğu ancak diğer dokulara nazaran pankreasın ekzokrin kısmında bu etkisinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Lilja ve ark., 1977). Bir glutamin analogu olan azaserin substrat olarak glutamini kullanan birçok enzimin aktivitesini etkiler. Glutamin genel olarak *de nova* purin

sentezinde kullanılır. Bu metabolik yolda, azaserin aminotransferaz enziminin aktif bölgesindeki peptid-SH grubuyla reaksiyona girer ve glutaminden azot transferini geri dönüşümsüz olarak inhibe eder (Smith ve ark., 1983). Enzim aktivitesi üzerindeki etkisinden başka, azaserinin DNA'da hasar meydana getirdiği de tespit edilmiştir (Lalja ve ark., 1977). İnsan hücrelerinde iki farklı şekilde lethal DNA hasarına sebep olduğu ileri sürülmüştür. Bunlar karboksimetile edilmiş baz ve O₆ metilguanindir (O'driscoll ve ark., 1999). Azaserinin tanımlanan bu etkileri daha çok tümör oluşumuna katılmasında önemli olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte azaserinin neden olduğu tümör gelişiminde diğer birçok faktör katkıda bulunabilmektedir. Azaserin, dokularda kanser meydana getirmez. Azaserin daha çok pankreasın ekzokrin kısmında tümör oluşumuna neden olur.

Azaserin bazı amino asitlerin hücre zarından taşınımına karıştığı bilinmekte olup, γ -glutamil transpeptidaz implante edilen eritrositlere azaserin uygulanması sonucu glutamin ve alanin alınımında inhibisyon etkisi meydana getirmiştir (Kalra ve ark., 1981). Azaserin daha çok hücrelere glutamin girişinde inhibisyon etkisi gösterdiği varsayılmaktadır (Low ve ark., 1991). Bu nedenle azaserinin madde transportu üzerine kanser yapıcı etkisinin neden olabileceği düşünülebilir. Azaserinin hücre zarından madde taşınımını etkilediğine dair bulgular mevcuttur. Azaserin, pürinlerin -SH gurupları ile reaksiyona girerek enzimleri geri dönüşümsüz olarak inaktif hale getirmektedir. Sülfidril reaktif bileşik NEM (N-ethylmaleimide) membranın -SH guruplarıyla tepkimeye girmekte ve hücrelerin transport özelliklerini etkilemektedir (Dawson ve Widdas., 1963; Levy ve Llyne., 1984; Escobales ve Figueroa., 1991). Bu nedenle membrandaki hassas proteinlere kovalent olarak bağlanabilirse azaserin hücre membranının transport özeliğini değiştirebilir. Ayrıca azaserin yapısal olarak glutamin amino asitine benzerlik gösterir; diğer amino asitlerle aynı transport yolunu paylaşabilir veya belirli amino asitlerin hücrelerden giriş ya da çıkışını inhibe edebilir. Bu yüzden azaserin belirli amino asitlerin hücre içi varlığını sınırlayabilir.

Bu çalışmada, insan eritrositleri bir model sistem olarak kullanarak azaserinin sistein transportu üzerine olan muhtemel etkisini araştırdık. Bulgular, azaserinin önemli derecede sisteinin transmembran transportuna karıştığını göstermekte olup, azaserinin bu etkisinin iki farklı mekanizma ile tümör oluşumuna katılabileceğini düşünmekteyiz. Azaserin, hücrelerden sistein çıkışını uyararak hücre içi sistein varlığını sınırlayabilir,

veya; azaserin sistein değişim mekanizmaları aracılığıyla hücelere girererek hücelerde birikir, ve hücelerde biriken azaserin hücrede hasara neden olarak tümör gelişimine neden olabilir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ohtsuka ve ark., 1988'de eritrositlerde sistin transportunu araştırmışlar olup, eritrositlerin oluşum safhasından sonra nükleuslarını ve birçok sitoplazmik enzimlerini kaybettiklerini, bu yüzden protein sentezi yapamadıklarını, ancak, hücrelere taşınan aminoasitlerin glutatyon (GSH) sentezi için gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Murray ve ark., 1996'da eritrositlerin membran ile çevrili sitoplazma kısımlarında % 33 oranında çözünmüş hemoglobin bulunduğunu ve oksijen taşıyıcı bir molekül olan hemoglobinin eritrositlerin asidik boyanmasına neden olduğunu saptamışlardır.

Junqueira ve ark., 1998 yılında eritrositlerin basit bir metabolizmaya sahip olduklarını ve gerekli enerji kaynaklarının glikoz olduğunu, glikozun % 90'mı anaerobik olarak laktata dönüştürdüklerini ve geri kalan % 10'luk kısmı ise heksoz monofosfat yoluyla aerobik olarak kullandıklarını belirtmişlerdir.

Armutcu ve ark., 2004'de alkol bağımlısı insanların eritrositlerinde yaptıkları çalışmada insan eritrositlerinin çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olduğunu, moleküler oksijen ve Fe^{+2} iyonları nedeniyle lipoperoksidatif hasara özellikle yatkın olduklarını göstermişlerdir.

Lunn ve ark. 1979'da yaptıkları çalışmada eritrositlerin, redoks tepkimeler sonucu meydana gelen süperoksit radikalinin ve ilaçların toksik etkilerinin uzaklaştırılmasında rol oynayan glutatyonu (GSH) yüksek miktarda içerdiklerini belirtmişlerdir. Glutatyon (GSH), eritrositlerin ortalama \pm 120 gün olan yaşamlarını sürdürmeleri ve kendilerini toksik maddelerden koruyabilmeleri için gerekli vazgeçilmez bir antioksidant molekül olup, daha çok memeli hücrelerinde düşük molekül ağırlıklı tiyol grubu içeren bir tripeptid olarak bulunur.

Griffith 1999 yılında düşük molekül ağırlığına sahip GSH'ın hücreleri oksidatif stres ajanlarına ve reaktif elektrofillere karşı koruyan önemli bir antioksidan olduğunu ileri sürmüştür.

Sistein ve sistein türevleri aktif sitotoksik T hücreleri ve T hücre klonlarının bazı döngülerinde DNA sentezini sitümüle ettiği ve böylece T hücreleri aracılığıyla immun tepkimelerde etkinlik kazandığı bilinmektedir. Zhang ve ark., 2003 yılında meme

kanserli hastalarla yaptıkları bir çalışmada, sistein ve sistein türevlerinin meme kanserinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu, yüksek plazma sistein konsantrasyonunun meme kanseri riskindeki bir azalmayla yakından ilişkili olduğunu ve bir sistein türevi olan N-asetilsisteinin antikarsinojenik ve antigenotoksik özellik gösterdiğini ve bu nedenle karsinogenez yolunun çeşitli basamaklarında etkin rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Robbins ve Kumar, 1987 yılında bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların metabolizması sonucu açığa çıkan radikallerin, karbonhidrat, protein ve nükleik asit gibi anahtar moleküllerle tepkimeye girdiği ve hücrelerde hasar oluşumuna neden olduğunu belirtilmişlerdir. Kalra ve ark., 1981'de insan eritrositlerini γ -glutamil transpeptidaz enzimi ile muamele ederek yaptıkları çalışmada, azaserin ve serin borat gibi inhibitör ajanların insan eritrositlerinin membranında bulunan bu enzimi inhibe ettiğini ve azaserinin alanin ve glutamin gibi amino asitlerin zardan transportunu engellediğini tespit etmişlerdir. Hruban ve ark., 1965 yılında azaserin kullanarak yaptıkları çalışmada, tümör oluşumunun önlenmesi için uzun süre kullanılan azaserinin, vücutta ikincil bir etki meydana getirdiğini ve pankreas kanserine neden olduğunu saptamışlardır. Longnecker ve Curpey, (1975) yılında azaserin-sıçan modelini geliştirerek bu kimyasalın, sıçanların pankreaslarının ekzokrin bölgesinde neoplastik değişimlere neden olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.1. Azaserin

Azaserin (o-diazoasetil-L-serin) *Streptomyces spp* mantar kültürlerinden izole edilen anti-metabolik özelliğe sahip bir madde olup Ames *Salmonella thyphimurium* testinde mutajenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Longnecker, 1984). Antibiyotik olarak izole edilen bu madde, pek çok tümör ve mikroorganizmaları inhibe edici etkiye sahip mikotik bir toksindir. Azaserin bilinen iki mekanizmayla hücre ölümüne neden olur.

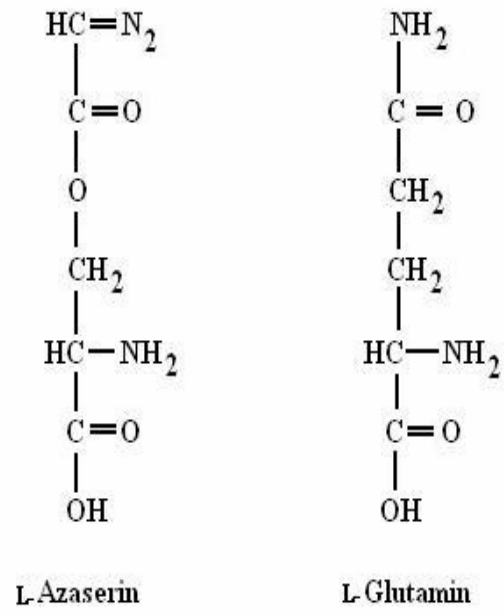
- a) Nükleik asit biyosentezi inhibisyonu
- b) Amino asit biyosentezi inhibisyonu

Azaserinin inhibisyon etkisi organizmalar arasında farklılık gösterir. Nükleik asit sentezi daha çok zarar gören sentez aşamalarındandır. Azaserin, glutamin analogu olup, *de nova* pürin sentezini inhibe eder (Gots ve Gollub., 1956). Lılja ve ark., 1977 tarafından belirtildiğine göre, azaserinin *de nova* pürin biosentezini inhibe ederek hücrelerin nükleotid miktarının azalmasına ve buna bağlı olarak DNA onarım mekanizmalarının gerilemesine sebep olmaktadır (Lılja ve ark., 1977). Azaserin, toksik etkisi nedeniyle glutamin aminotransferazların farklı gruplarının inhibisyonuna neden olur (Lyons ve ark., 1990). Azaserin hücrelerin DNA'sında hasar meydana getirir. Gözlenen hasar tipleri pürin ve pürimidin bazlarının alkilasyonu olup, alkilenen bazlar enzimatik olarak endonükleaz veya glikozidaz enzimleri aracılığıyla ortamdaki uzaklaştırılır (Lılja ve ark., 1977). Longnecker ve Curphey (1975) tarafından geliştirilen azaserin-sıçan modeli kullanılarak yapılan son yıllardaki çalışmalarda azaserinin meydana getirdiği foci ya da pankreas asinar hücre nodülleri tespit edilmiştir (Öztaş, 1993). Azaserin, asidofilik ve bazofilik olarak adlandırılan iki farklı tip foci meydana getirmektedir (Roebuck, 1986). Azaserin yapısal olarak glutamine benzer olup, glutamin gerektiren sentez reaksiyonlarında glutamin ile yarışarak bu reaksiyonları geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Azaserin ve glutaminin yapısal olarak benzerliği Şekil.1.1'deki gibidir. Enzimlerin aktif kısımlarındaki elektronca zengin bölgelere ve glutamine kovalent olarak bağlanmakta olup, bu enzimlerin aktivitelerini geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Azaserin varlığında nükleotid ara ürünlerinin biriktiği tespit edilmiş olup, azaserin hücre yüzeyinde bulunan bir enzim olan γ -glutamil transpeptidaz (GGT) enzimini bloke eder. Başlangıçta azaserinin di azo grubu enzimin tiol grubuna kovalent olarak bağlanır ve bir inhibisyon etkisi meydana getirir. Hartman ve ark., (1956) tarafından belirtildiğine göre, azaserinin pürin öncülü olan glutaminden, azot transferini engelleyerek pürin sentezini bloke ettiği ileri sürülmüştür (Aaronson, 1959). Glutamin, arginin ve glutamik asit gibi amino asitlerin azaserinin inhibe edici etkisini engellediği ve azaserinin inhibisyon etkisinin engellenmesinde argininin glutamik asitten daha etkili olduğu, bu etkinin yaklaşık olarak glutamine eş değerde olduğu tespit edilmiştir (Aaronson, 1959). Azaserinin, insanlarda sağlık açısından zararlı yan etkiler meydana getirmesi bu ilacın kemoterapik bir ajan olarak kullanılmasını güçleştirmiştir. İnsan ve farelerin damar içine (intravenöz) azaserin enjekte edilerek yapılan çalışmada bu kimyasalın insan ve fare dokularından

uzaklaştırılması karşılaştırılmıştır. Enjeksiyondan sonra yapılan analizler sonucunda her iki dokuda da azaserinin uzaklaştırılmasında önemli derecede farklılık görülmüştür. İnsan ve fare kanlarının analizlerinde bu ilacın fare dokularından insan dokularına nazaran daha hızlı uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir (Henderson ve ark., 1957). Azaserin enjeksiyonundan sonra ilacın hücrelerle doğrudan temasının sadece 8-10 dakika içerisinde gerçekleştiği ve yaklaşık 12 dakika içerisinde *de nova* pürin sentezini bloke ettiği ve bunun geri dönüşümsüz bir reaksiyon olduğu belirtilmiştir (Henderson ve ark., 1957).

Sıçanlarda (Wistar/Lewis) yapılan bir çalışmada azaserinin bu hayvanların karaciğer böbrek ve pankreaslarında kansere neden olduğu tespit edilmiştir (Lilja ve ark., 1977). Azaserin enjekte edildikten kısa bir süre sonra öldürülen hayvanların pankreas DNA'ları incelendiğinde azaserinin DNA'yı alkileştirdiği ve mutasyona sebep olduğu gözlenmiştir. Alkalin sükröz gradyent teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalarda azaserinin DNA'da guanin bazının 7. azotu (N₇) ile 6. oksijen (O₆) atomunda alkillasyon meydana getirdiği saptanmış olup, guanin bazının N₇ pozisyonu kanser oluşumunda daha fazla potansiyel önem taşıdığı belirtilmiştir (Lilja ve ark., 1977).

Longnecker ve Curphey (1975) tarafından, azaserin ile muamele edilen sıçan dokuları incelendiğinde, böbreklerde karaciğerden ve pankreasta ise böbreklerdekinden daha fazla tümör meydana getirdiği belirtilmiştir (Lilja ve ark., 1977). Bu üç dokuda tümör oluşumundaki farklılığın DNA onarımındaki farklılıktan ya da replike olan hücre kısımlarındaki fonksiyon farkından dolayı olabileceği tahmin edilmektedir. 5mg/kg azaserinle altı ay süresince haftada bir ya da iki defa muamele edilen hayvanlar bir veya iki yaşında öldürüldüğünde pankreasda % 43 böbreklerde % 27 ve karaciğerde % 5 tümör meydana geldiği gözlenmiştir (Lilja ve ark., 1977). Azaserin ile pankreasın ekzokrin kısmında meydana gelen neoplastik yapıların farklı histolojik özellikler gösterdikleri ve çoğunluğunun karaciğere, lenf nodüllerine ve akciğerlere yayıldıkları (metastaz) saptanmıştır (Longnecker ve ark., 1981). Aynı dozda azaserinin, erkek sıçanlarda dişi sıçanlara oranla daha fazla tümör oluşturabileceği ileri sürülmüştür. Aynı dozda azaserin enjekte edilen erkek ve dişi sıçanlarda pankreas kanseri oluşumunda dişilere nazaran erkeklerde yüksek bir artış gözlenmiştir (Lhoste ve ark., 1987).



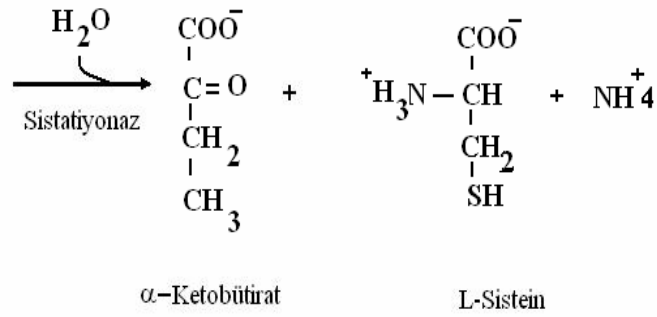
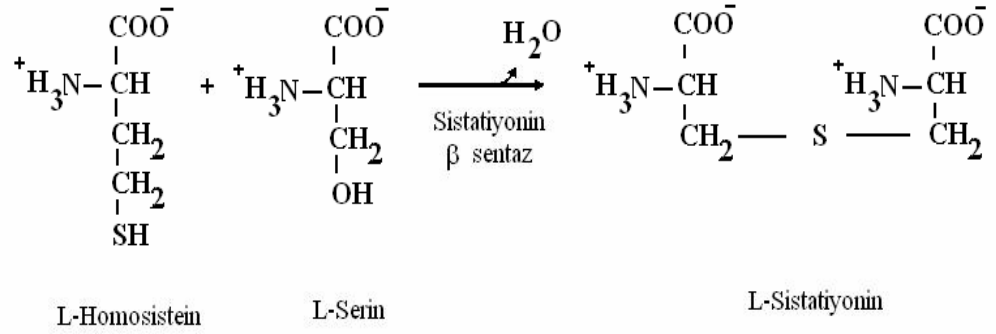
Şekil 1.1. L-glutamin ve L-azaserin'in kimyasal yapısı (Aaronson, 1959).

2.2. L-Sistein ve Hücresel Önemi

L-sistein serbest –SH içeren önemli bir amino asittir. Hücrelerde protein sentezi için gerekli olmakla birlikte, önemli bir tripeptid olan glutatyon (GSH)'un sentez hızının belirlenmesinde görev alır. Glutatyonun fonksiyonel –SH grubu bu amino asitin varlığından kaynaklanmaktadır (Yıldız ve ark., 2005). Sistein'deki sülfidril grubu, metiyoninin homosistein kısmından, karbon iskeleti ise serinden gelmektedir. Bu iki amino asit sistatyonin β -sentetaz enzimi aracılığıyla birleştirilerek sistein amino asitini meydana getirmektedir (Conway ve ark., 2000). Vitamin B₆, B₁₂ ve folat sistein sentezini düzenleyici birçok reaksiyonda yer alır. Homosistein ve metiyonin birbirlerine dönüşümü çok hızlı gerçekleşir. Hücrede metiyonin arttığı zaman, homosistein sistatyonin vasıtasıyla sisteine katalizlenir. Bu işlem pyrodoksal 5'-fosfata bağlı iki enzim, sistatyonin β -sentaz ve γ -sentataz enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilir (Zhang ve ark., 2003).

Sistein ezimlerin aktif merkezinde rol alan bir amino asit olup, sisteinin –SH grubu özellikle enzimatik reaksiyonlarda rol oynar. Belirli koşullarda hidrojen kükürten ayrılır ve kükürt negatif yük kazanır. Eksi yüklü kükürt nükleofilik özelliğe sahip olup, enzimlerin aktif merkezinde rol oynamaktadır (Gözükara, 2001). Aktif merkezinde sistein bulunan enzimlerde sistein parakloromerkuribenzoik asit (PKMBA) kullanılarak tayin edilir. Sisteinin –SH grubu PKMBA'nın oluşturduğu bileşiğe merkaptit kompleksi adı verilir. Bu kompleksin 255 nm dalga boyundaki absorbansı bir tepe değeri verir. Absorbanslar arasındaki farkın hesaplanması sonucu enzimin aktif merkezinde yer alan sisteinin sayısı belirlenir (Gözükara, 2001). Sistein besinlerle alınan esansiyel olmayan bir amino asittir (Conway ve Chappel., 2000). Hücresel ortamda metiyonin amino asiti mevcut olduğu sürece sistein metiyoninden sentezleneceği için sistein esansiyel bir amino asit olarak kabul edilmemektedir. Sistein'in kimyasal yapısı ve hücre içi sentezi Şekil.1.2'deki gibidir.

Sistein, bütün hücrelerin sitozolünde GSH sentezine katılan bir amino asit olup, (Lu ve ark., 1996) olgunlaşmış insan eritrositleri sitoplazmik organellerini ve birçok enzimlerini kaybettikleri için protein sentezi yapamazlar. Ancak, bu hücreler çeşitli kimyasalların elimine edilmesinde rol alan glutatyonu (GSH) yüksek miktarda ihtiva ederler (Luun ve ark., 1979).



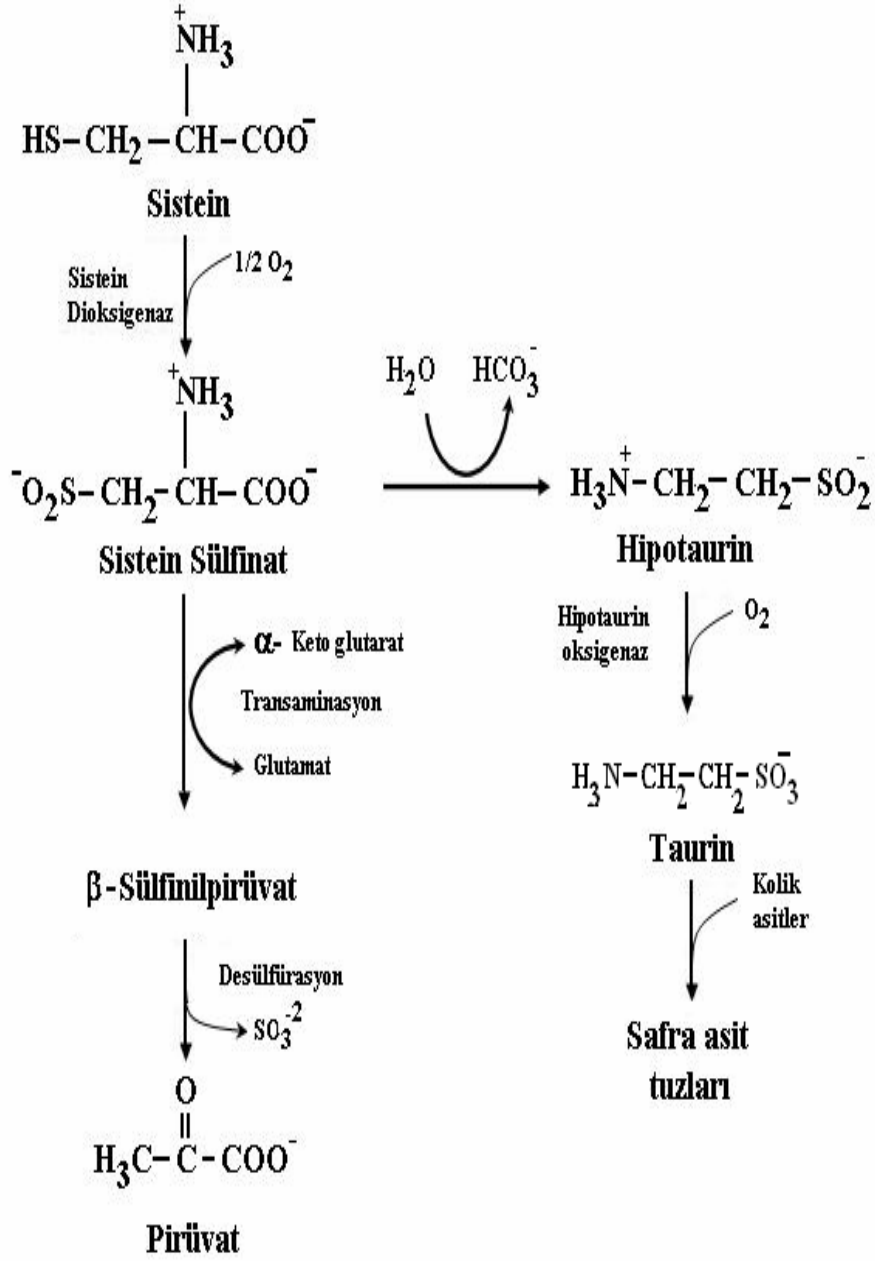
Şekil.1.2. L-sistein'in genel yapısı ve sentezi (Conway ve ark., 2000)

Bu nedenle hücre içerisine alınan sistein, oksidatif stres ve çeşitli toksik ajanlara karşı hücreleri koruyan glutatyonun sentez hızını düzenler ve hücre içi konsantrasyonunun dengede tutulmasında rol oynar (Bender, ve ark., 2000). Ayrıca, hücre içi antioksidant olarak karsinojenlerin detoksifiye edilmesinde de işlev görür. Sistein ve sistein türevleri fizyolojik şartlar altında reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan transkripsiyon faktörü nükleer faktör NF- K_B ve interlökin-2 reseptör α zincir, tümör nekroz faktör TNF- α , MHC dâhil birçok nükleer faktör K_B bağlı genlerin ekspirasyonunu inhibe eder. Daha çok aktif sitotoksik T hücreleri ve T hücre klonlarının DNA sentezini sitümüle eder. Böylece, T hücreleri aracılığıyla immun tepkimelerde düzenleyici rol oynar (Zhang ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalar, oksidasyonun büyük moleküllerde geri dönüşümsüz hasar meydana getirdiğini ve uyarı mekanizmalarında hasar oluşumuna neden olduğunu göstermektedir (Jones ve ark., 2002). Daha çok sistein tiyollerini hedef alan oksidasyonun, enzimlerin, reseptörlerin (almaç), iyon kanallarının, taşıyıcılar ve transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları için tehdit oluşturduğu tespit edilmiştir (Jones ve ark., 2002). Sistein, memeli sistemlerinde normalin üstündeki konsantrasyonlarda toksik bir etki meydana getirdiğinden dolayı ortamdaki hızlıca okside edilerek uzaklaştırılır. Böylece plazmada daha az konsantrasyonlarda tutulması sağlanmış olur (Jones ve ark., 2002).

Hücre içerisine sistein alınımı, genelde Na^+ ve ATP'ye bağımlı ASC sistemi ve Na^+ dan bağımsız taşıyıcı sistemler aracılığıyla olmaktadır (Palacın ve ark., 1998). Sodyumdan bağımsız anyonik amino asit taşıyıcı sistem X_c^- bire bir sitokiyometri (stoichiometry) ile L-glutamat için L-sistin değişimine aracılık eder. Sistein hücre dışı sıvıda (ekstraselüler sıvı) L-sistine dönüşür ve hücre içerisine alınan L-sistin hızlıca L-sisteine indirgenir (Ruiz ve ark., 2002).

İnsanlarda sistein katabolizmasının en önemli son ürünleri inorganik sülfat, taurin ve pirüvattır. Sistein katabolizması üç aşamada gerçekleşir. Sistein deoksijenaz enzimi varlığında oksitlenme sonucu sistein sülfünatın amino grubunun α -ketoglutarata aktarılması sonucu β -sülfünil-pirüvat ve glutamat oluşur (Onat ve ark., 2002). Sistein sülfünatın dekarboksilasyonu sonucu önce hipotaurin ve sonra oksidasyon sonucu taurin oluşur. Taurin karaciğerde kolik asit ve safra asit tuzlarına dönüştürülür. Sistein katabolizması Şekil.1.3'deki gibidir.

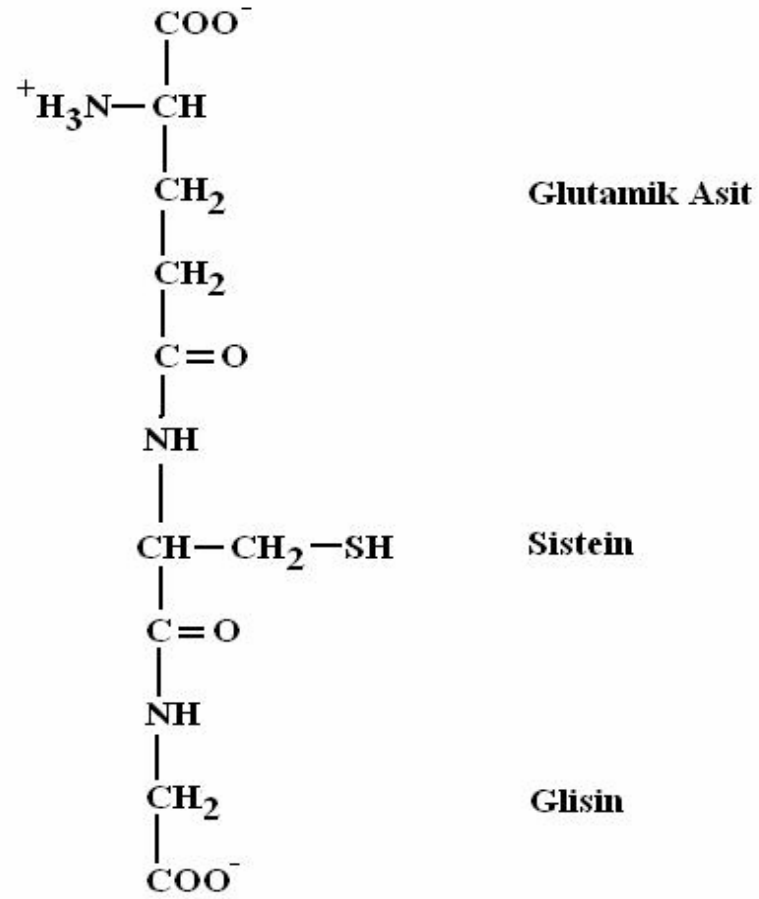


Şekil.1.3. Sistein Katabolizması (Onat ve ark., 2002)

2.3. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (γ -glutamilsisteinilglisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı bir tripeptiddir. İlk defa 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiştir. Daha önceleri glutamil-sisteinden ibaret bir dipeptid olduğu düşünülmüş ve 1929 yılında kristal yapısı elde edildikten sonra tripeptit yapısında olduğu fikrine varılmıştır (Gözükara, 2001). Molekül ağırlığı 307 gram olan bu bileşik tüm bitki ve hayvan hücrelerinde en fazla hücre içi antioksidan olarak bulunduğu tahmin edilmektedir. GSH'daki peptidik γ bağlantısı, tripeptit yapısının aminopeptidazlar tarafından yıkılmasını önler (Gözükara, 2001). Pek çok enzim GSH'ı etkilemezken sadece pankreatik karboksipeptidaz glutatyondan glisini kopararak yapıyı bozmaktadır. Glutasyon çözünebilir bir antioksidan olarak lipid peroksidasyonu ve ilaçların toksik etkilerine karşı hücrelerin savunulmasında görev almaktadır (Ulakoğlu ve ark., 1998). Ayrıca pek çok kimyasalın toksik etkisinin inhibe edilmesinde ve hücre hasarının önlenmesinde önemli bir role sahiptir. GSH'ın toksik maddelerle oluşturduğu tepkimeler glutasyon S-transferaz tarafından katalizlenmekte ve glutasyon konjugatları şekillenmektedir (Keppler, 1999).

Glutasyon konjugatlarının aktif transportu, daha çok insan eritrositlerinde gösterilmiştir. Hücrelerden glutasyon -S konjugatlarının bırakımı Multi Drug-Resistance Protein (MRP) ailesine ait olan integral zar glikoproteinlerince yapılan ATP bağımlı aracı bir işlemdir. Glutasyon, glukuronat ya da sülfat ile konjuge edilen birçok lipofilik bileşik, MRP ailesinin substratı olarak rol oynar (Keppler, 1999). İnsanlarda MRP ailesinin farklı genlerce kodlanan 6 izoformu klonlanmıştır. İnsan MRP1 ve MRP2 iç-dış membran veziküllerine ATP bağımlı transportunun substrat spesifitesine göre ölçümleri en iyi şekilde karakterize edilmiştir (Keppler, 1999). Glutasyon sentetaz enzimi aracılığıyla hücrelerde bir kere sentezlenen glutasyon biyolojik zarlardan transporta maruz kalır. GSH salınımı asıl sentez kaynağı olan karaciğerde gerçekleşir (Murray ve ark., 1998). Hücrelerde, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres durumunda hızlıca okside olur ve GSSG formuna dönüşür. Bu formu hücrelerden aktif taşıma ile uzaklaştırılır. 1955'lerde glutasyonun insan eritrositlerinde yarı ömrünün 3-4 gün olduğu belirtilmiş (Olive ve Board, 1994). Bir hücre içi antioksidan olan glutasyonun kimyasal yapısı Şekil 1.4'deki gibidir.



Şekil 1.4. Glutatyonun Kimyasal Yapısı (Gözükara, 2001)

Hücre içi Antioksidan Olarak Glutasyon Sentezi ve Önemi.

Glutasyon, sistein, glisin ve glutaminden γ -glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz enzimlerinin birbirini takip eden faaliyetleri sonucu iki basamakta sentezlenir (Griffith, 1999). DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, detoksifikasyon, hücre içi ve dışı taşınım gibi hücrel fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır (Ulakoglu ve ark., 1998). Glutasyon, aminoasit taşıyıcısı olarak ve hücrel proteinlerdeki SH gruplarının indirgenmiş halde tutulmasında rol oynamakta ve bu yolla eritrositleri oksidatif hasardan korumaktadır (Onat ve ark., 2002). Hücreler tarafından GSH konsantrasyonunun sabit tutulduğu ve bu miktarın 1–8 mM arasında olduğu belirtilmektedir (Griffith, 1999). Glutasyon hücrel redoks durumun belirlenmesinde önemli bir metabolit olup, hücrelerde okside (GSSG) ve indirgenmiş (GSH) glutasyon formunda bulunur (Yang ve ark., 2006). Reaktif oksijen türlerinin varlığında indirgenmiş glutasyon glutasyon peroksidaz ve NADP^+ elektron akseptörleri varlığında okside glutasyona dönüşür. GSSG pentoz fosfat yolu sonucu elde edilen NADPH^+ varlığında glutasyon redüktaz tarafından tekrar indirgenmiş (2GSH) glutasyon formuna dönüştürülür (Champe ve Harvey., 1997).

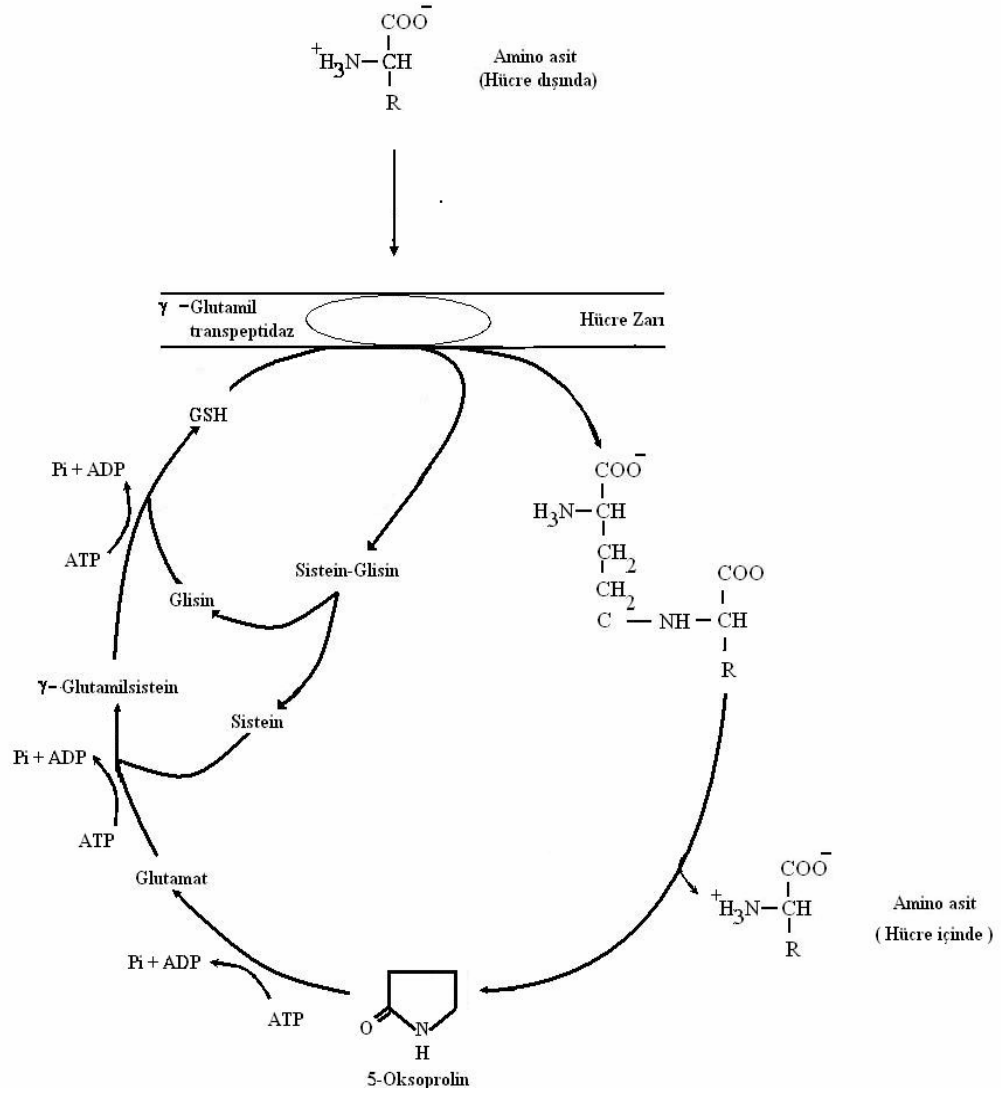
Glutasyon'un hücre içi sentezi gerçekleşirken hücre içerisine lokalize olmuş γ -glutamil transpeptidaz enzimi tarafından GSH parçalanır. Bu enzim özellikle membranın dış yüzeyinde bulunur ve daha çok sistein ve metiyoninin hücre içine alınmasını sağlar (Voet ve Voet., 1995). Glutasyonun γ -glutamil grubu hücre dışında bulunan bir amino aside transfer edilir ve böylece γ -glutamil amino asit hücre içine alınır. Hücre içine alınan amino asit serbest bırakılır ve iki adımda glutamata dönüşür. Daha sonra bir ara ürün olan 5-oksiptrolin şekillenir. Oksiptrolin kararlı bir bileşik olup hidrolizi için ATP gereklidir (Voet ve ark., 1995). Glutasyon sentezi Şekil.1.5'de gösterilmiştir. Eritrositler yüksek miktarda glutasyon içerir (Kalra ve ark., 1981). Glutasyon eritrosit membranının bütünlüğü için vazgeçilmez bir bileşiktir. Glutasyon, oksidatif stres altında hemoglobin ve diğer tiol içeren proteinlerin bozulmasını önler (Srivastava ve Beutler., 1970). Glutamat, sistin ve glisin eritrosit hücrelerine taşınarak GSSG'nin azalan konsantrasyonunun yeniden restorasyonu için kullanılır (Ohtsuka ve ark., 1988). Pentoz fosfat yolu sonucu meydana gelen NADPH alyuvar ve hepatosit gibi

hücrelerde elektron vericileri olarak işlev görürler. Enzim eksikliği sonucu pentoz fosfat yolu bozulacak olursa NADPH üretimi eğeleneceğinden eritrositler yoğun hasara maruz kalır (Murray ve ark., 1996). Gulukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği bulunan bireylerin eritrositleri yeteri miktarda okside glutatyonun redükte glutatyona dönüştürecek kadar NADPH içeremedikleri için H_2O_2 ve oksijen radikallerinin ortamdan uzaklaştırılmazlar (Conway ve Chappel., 2000). Yaşlı eritrositler yeterli NADPH sentezinden yoksun oldukları için kolay hemoliz olurlar. Yeterli NADPH üretilmediğinde zardaki -SH guruplarının oksidasyonu ve lipid radikal etkileşimi sonucu peroksidasyon oluşumuyla eritrosit zarı erir (Murray ve ark., 1996). Hemoglobinin serbest radikal etkileşimi sonucunda hemoglobinin bazı -SH gurupları oksitlenir ve protein hücre içerisinde çöker. Oksidatif stres vücudun oksidant-antioksidan dengesini bozarak hücre içi antioksidan olan GSH düzeylerinde azalmaya ve hücrelerin yoğun bir şekilde oksijen radikallerine maruz kalmasına neden olur (Onat ve ark., 2002). Bunun sonucunda membran lipidleri ve hücrenin çeşitli yapısal proteinlerinde hasar oluşumu meydana gelmektedir. Oksidan-antioksidan dengeinin bozulması sonucu ortamda biriken GSSG'de -SH içeren yapılarla etkileşerek hasar oluşumu meydana getirmektedir (Ulakoglu ve ark., 1998).

Glutatayon, sinir sisteminde de önemli bir antioksidan olup, insanlarda Alzheimer veya Parkinson gibi nörolojik hastalıkların, glutatayonun indirgeme/yükseltgenme basamaklarındaki bir bozukluktan ya da glutatayon eksikliğinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Wegrzynoicz ve ark., 2007)

2.4. L-Glutamin

L-Glutamin pürin ara ürünleri ve türevleri 5-fosforibozilamin, N-formilglisinamid (FGAM), GMP, NAD ve NADP dahil çeşitli biyosentetik tepkimelerde amino grubu sağlayıcısıdır (Lyons ve ark., 1990). Merkezi sinir sistemi, doku ve beyin omurilik sıvılarında oldukça fazla bulunan bir amino asittir (Albrecht ve ark., 2007). Glutamin plazmada en fazla bulunan serbest amino asittir. Bu amino asit



Şekil 1.5. Glutatyon Sentezi (Conway ve Chappel., 2000).

için kanla beyin dokularının talebinin karşılanması yetersizdir. Bu talep beyin astroglial hücrelerinde bulunan glutamin sentetaz aracılığıyla glutamattan sentezlenerek karşılanır (Albrecht ve ark., 2007). Bu reaksiyon ATP hidrolizinden sağlanan enerji ile glutamata NH_4^+ bağlanmasıyla gerçekleşir. Sentezlenen glutamin nörotransmitter olarak işlev görmektedir. Büyük bir kısmı astrositlerde sentezlenir ve nöronlara gönderilir. Ayrıca bir inhibitör nörotransmitter olan γ -aminobütrik asit (GABA) öncülüdür (Onat ve ark., 2002). Glutaminin bir kısmı yakıt olarak bağırsak mukoza hücrelerinde de kullanılmaktadır. Glutamin güçlü bir endotelial nitrik oksit (NO) sentez inhibitörüdür ve glutaminin metabolizması hakkında çok az bilgi mevcuttur (Wu ve ark., 2000). Ayrıca, asit baz dengesinin korunmasında önemli olan amonyak, glutamin hidrolizi ile elde edilmektedir.

Karaciğer yetmezliği ile ilişkili olan hiperammonemi sırasında kandan beyine geçen amonyak nöral glutaminazı inhibe eder. Beyinde glutamin aşırı birikmesi sonucu beyin fonksiyonlarında aksaklıklara neden olur (Albrecht ve ark., 2007). Glutamin, havadaki serbest azotun diğer amino asitlerin yapısına katılmasında da rol oynayan bir amino asittir. Ayrıca, beyin dışında kas ve karaciğerde de sentezlenir. Amonyağın (NH_3) toksik olmayan taşınım ve depolama şeklidir. Glutamin, taşıma görevinden dolayı plazmada başka amino asitlerden iki kat daha fazla konsantrasyonda bulunur (Champe ve Harvey., 1997).

2.5. Süperoksit Oluşumu ve Antioksidan Savunma Arasındaki İlişki

Serbest radikaller en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren kimyasal maddelerdir. Ancak Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Bu durumda radikal ileri derecede reaktiftir, stabil değildir ve protein lipit ve karbonhidrat gibi organik ve inorganik kimyasal maddelerle hücre içinde tepkimelere girer (özellikle membranlar ve nükleik asitler içindeki anahtar moleküllerle). Serbest radikaller otokatalitik tepkimeler başlatarak molekülleri yeni serbest radikallere dönüştürür. Böylece zincirleme zedelenmeyi başlatırlar. Hücre içinde radikaller radyan enerji emilimi ile (Ultraviyole, X-ışınları gibi) ya da normal fizyolojik olaylar sırasında ortaya

çıkan redüksiyon-oksidasyon (redoks) tepkimelerinden veya ekzojen kimyasal maddelerin enzimatik metabolizmalarından köken alırlar (Robbins ve Kumar, 1987). Diğer bir serbest radikal, moleküler oksijenin indirgenmesi sonucu oluşan süper oksit O_2^- dir. Mitekondiriyal elektron transportu esnasında oluşan süperoksit (O_2^-) anyonları, süper oksit dismutaz enzimi tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülerek elimine edilirler (Dillioğlugil ve ark., 2005). Hidrojen peroksit GSH'ın kofaktörlüğünü yaptığı glutatyon peroksidaz (GP_x) enzimi tarafından ortamdaki uzaklaştırılır (Ulakoğlu ve ark., 1998). Vücutta bulunan oksijen fazlası reaktif oksijen türlerinin oluşumunu başlatabilir. Hidroksil (OH^-) radikalleri, miyokard hücreleri ve kandaki akyuvar hücreleri tarafından üretilmekte, lipid peroksidasyonu, DNA ve proteinlerdeki -SH guruplarıyla oksidasyonu sonucu hücrelerde hasarlara neden olmaktadır (Murray ve ark., 1996). Beyin, karaciğer ve böbrek gibi yoğun metabolik aktiviteye sahip dokular daha fazla oksijen tüketimine sebep olurken aynı zamanda diğer dokulara nazaran daha fazla antioksidan kapasiteye sahiptirler (Düzova ve ark., 2006). Dokular, oksidatif strese neden olan serbest radikalleri ihtiva eder. Bu serbest radikaller; hücre ölümü, hızlı yaşlanma, kanser, kalp hastalıkları gibi disfonksiyonel bozuklukların oluşumunda rol oynamaktadır (Ruiz ve ark 2002).

Eritrositler çoklu doymamış yağ asitleri ve hemoglobin demirinden dolayı oksidatif hasara yatkındırlar (Armutcu ve ark., 2004). Hidroksil radikalleri, membranlarda demirin katalizlediği fenton reaksiyonu aracılığıyla lipid peroksidasyonunu başlattığı varsayılmaktadırlar. Vücutta, bu radikallerin oluşumunu durduran biyolojik olarak büyük bir öneme sahip antioksidan adı verilen biyolojik savunma sistemleri yer alır. Antioksidanlar serbest radikaller için kolay bir elektron hedefidirler (Clarkson, 1995). Eritrositler, katalaz, sistein, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz gibi enzimsel antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler (Gültekin ve ark., 2001). Bu enzimlerin aktiviteleri Şekil 1.6 ve Şekil 1.7'deki gibidir.

Enzimatik antioksidanlar eritrositlerde oksidatif stres oluşumunu engelleyebilirler. Süperoksit dismutaz süperoksit radikalini (O_2^-) daha az zararlı olan hidrojen peroksit (H_2O_2) indirger. Hidrojen peroksit katalaz ya da glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından suya dönüştürülerek hücre ortamından uzaklaştırılması sağlanır (Champe ve Harvey., 1997). Eritrositler plazmadan yaklaşık beş yüz kat daha fazla

glutasyon içerirler (Zhang ve ark., 2003). E vitamini ve C vitamini gibi enzimatik olmayan antioksidanlar serbest radikallerin hücre membranından süpürülmesinde biyolojik olarak büyük öneme sahiptirler. Cases ve ark., 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada kısa süreli ağır egzersizlerden sonra lenfositlerde vitamin E ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimi araştırmışlar ve yaptıkları çalışma sonucunda ağır egzersize bağlı olarak vitamin E ve antioksidan enzim aktivitelerinde bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu antioksidan bileşiklerin hidrojen peroksit gibi radikallere karşı bir koruma sağladıkları belirtilmektedir (Gültekin ve ark., 2001).

Epifiz bezinden üretilen melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) immün sistem uyarıcısı, biyolojik saat ayarlayıcısı ve uykuya neden olan bir madde olarak bilinir. Bu maddenin daha çok son yıllarda serbest radikallerin uzaklaştırılmasında antioksidan olarak işlev gördüğü ve oksijen radikallerinden membran lipidlerini, sitozolik proteinleri ve DNA'yı koruduğu saptanmıştır (Gültekin ve ark., 2001).

NAC (N-asetil-L-sistein) mukolitik ve parasetamol zehirlenmesinden sonra oluşan akut karaciğer yetmezliklerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca hücre içi sistein ve glutasyonun sürekliliğinin sağlanmasında ve reaktif oksijen türlerinin hücrelerden süpürülerek uzaklaştırılmasında antioksidan ilaç olarak kullanılmaktadır (Gustafsson ve ark., 2005). NAC'ın epitel kökenli kolon kanserinde hücre çoğalması ve farklılaşmasını önlediği de saptanmıştır. Benzopyren, asetilaminoflorans ve siğara dâhil birçok kanserojen maddelerin DNA'ya bağlanmasını bloke eder. Pestisitler ve ilaçların (ksenobiotikler) kullanımına bağlı olarak açığa çıkan serbest oksijen türleri lipid peroksidasyon oluşumunu tetikleyici ajanlar olarak bilinmektedir.

Lipid peroksidasyonu, serbest oksijen türleri ile membran lipitlerinin etkileşimi sonucu oluşmakta ve daha çok moleküler düzeyde doku hasarına neden olmaktadır (Robbins ve Kumar, 1987). Lipid peroksidasyonun eritrositlerin antioksidan savunma mekanizmalarını etkilediği ve endojen ve ekzojen antioksidant miktarlarında önemli derecede azalmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (Gültekin ve ark., 2001).

2.6. Hücre Membranı ve Transport Sistemler

Hücreler içeriklerini dış ortamdan ayıran, plazma membranı ile çevrilidir. Plazma membranı lipit, protein ve daha az oranda karbonhidrat içeren moleküllerce

zengindir. Memeli plazma membranlarının yaklaşık % 50-60 kadarı fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin ve sifingomiyelin, geri kalan kısmını ise kolesterol ve glikolipidler oluşturmaktadır (Onat ve ark., 2002). Bunlardan kolesterol ve fosfolipidler membranların her iki tarafında yer alırken, sifingomiyelin ve fosfatidilkolin dış tabakada, fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin iç tabakada yer alır. Fosfolipidler membranın temel yapısal bütünlüğü ve seçici geçirgenliğinin sağlanmasında, proteinler ise farklı membranların çok özel fonksiyonlarından sorumlu olmaktadır. Zarda yer alan karbonhidratlar membranın dış yüzeyine yerleşik halde olup, glikoprotein veya glikolipid halinde bulunur. Karbonhidratlar kendilerine benzer hücreleri tanırlar ve doku oluşmasını sağlarlar. Ayrıca yabancı yapıları da tanıyarak immun cevap oluşumuna yol açarlar (Şimşek, 1994).

Kolesterol, membran akışkanlığının belirleyicisi olup, iki komşu yağ asidi arasına girerek Van der Waals çekim etkisini azaltmakta ve membrana akışkanlık sağlamaktadır. Lipid ikili tabakasına gömülü halde bulunan integral proteinler, membranın bir tarafından diğer tarafına geçecek şekilde yerleşmişlerdir. Membranın sitozolik yüzeyinde daha çok proteinin amino ucunun, miristik asit (C14) veya sistein amino asitlerinin yan zinciri üzerinden palmitik asit (C16) veya pirenil grupları (farnesil C15) ile kovalent bağlanmaktadır. Membranların kalınlığı 7,5-10 nm arasında değişmekte olup, sadece elektron mikroskopuyla görülebilirler. Bununla birlikte plazma mebranın kalınlığı boyunca yerleşim gösteren proteinler, hücre dış ortamından hücre içine gerekli organik ve inorganik maddelerin alımını, metabolizma sonucu meydana gelen hücre için zararlı atıkların dışarı atılmasını sağlar (Onat ve ark., 2002).

Bu moleküllerin seçici geçirgenliği membran proteinlerinden oluşturulan çok özel kanallarla sağlanmaktadır. Bu kanalların bazıları enerjiye gereksinim duymazken, bazıları ise enerjiye gereksinim duyar (Lehninger ve ark., 2005). Hücre membranlarında yapıları gereği değişik taşıma sistemleri bulunmaktadır. Hücre dışından içeriye madde taşınımına endositoz, dışına taşınımına ise ekzositoz adı verilir.

Hücre dışındaki ve içindeki sıvılarda milyonlarca molekül hareket halindedir. Bu hareketleri ile belirli bir yüzey alanını belirli bir zaman içinde geçerler. Enerji gereksinimi olmaksızın, konsantrasyon farkına bağlı olarak maddelerin yoğun olduğu taraftan daha az yoğun olan ortama doğru hareketine basit difüzyon denir.

Maddelerin hücre içi derişimleri eşit oluncaya kadar basit difüzyon devam eder (Noyan, 2000). Membrandaki elektiriksel potansiyel, bileşiklerin zıt yüke ait çözeltiye doğru hareket etmelerini sağlar. Membran iç kısmının hidrofobik olması, küçük ve kısmen nanopolar moleküllerin hücreye taşınmasını sağlar. Akciğerlerde gaz değişimi (O_2 alımı, CO_2 salınımı) hücrelerde basit difüzyon yoluyla olmaktadır (Lehninger ve ark., 2005). Karbondioksit (CO_2) ve su gibi moleküllerin geçirgenlik kat sayılarına bağlı olarak hücre içine ve dışına geçişleri olmaktadır. İyonlar (Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{+2}) ise mebran içerisine yerleşik bir kanal protein tarafından taşınmaktadır. İyonların, membranın bir tarafından diğer tarafına geçişi elektiriksel gradyent farkına bağlı olarak gerçekleşir. Yani membranın iki yüzü arasında bir elektiriksel potansiyel meydana gelir. Ligand kapılı bu kanallarda intraselüler ve ekstraselüler küçük moleküller allosterik taşıyıcı bir proteine bağlanır buna bağlı olarak bu kanallar açılır ya da kapanır (Lehninger ve ark., 2005).

Hücre membranında aquaporin olarak adlandırılan ve zarlarda suyun bir taraftan diğer tarafa hızlı geçişini sağlayan integral protein yapısında kanallar keşfedilmiştir. İnsan hücresinde bu kanallardan 11 tanesi bulunur ve her biri özelleşmiş bir göreve sahiptir. Plazma membranlarında aquaporinler yüksek bir yoğunluğa sahiptir. Böbrek, beyin, göz karaciğer gibi organlarda bol miktarda bulunmakta olup, özellikle böbrek proksimal tübül hücrelerinde beş tipi tanımlanmıştır (Lehninger ve ark., 2005).

Hücre membranlarında basit difüzyon enzimlerle değil zardaki proteinlerle olmaktadır. Pasif difüzyonda moleküller bir bölümden diğer bölüme proteinler aracılığıyla hareket ederler (Onat ve ark., 2002). Ancak bu proteinler taşınan bileşiğe özgül olarak bağlanmakta ve herhangi bir şekilde proteinde konformasyon değişikliği meydana getirmemektedirler. Membranda taşıma işini yapan bu proteinlere transporterlar veya permeazlar adı verilir (Lehninger ve ark., 2005). Kolaylaştırılmış taşımadaki proteinler hareketli olup, moleküllerin düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru taşınımında görev aldıkları için aktif taşımda olduğu gibi enerjiye gereksinim duyarlar. Yani aktif taşımda moleküllerin bir taraftan diğer tarafa taşınması için taşıyıcı bir hamala ihtiyacı vardır (Şimşek, 1994). Zardaki taşıma olayının aktif veya pasif olması, taşınan maddelerin serbest enerji değişimlerine bağlıdır. Aktif taşıma yapan sistemlerde taşıyıcılar tek yönde ve tek türle taşınımı

(uniport) yapabildikleri gibi, iki türün aynı yönde (simport) taşınımını da yapabilirler, taşıyıcılar iki molekülü aynı anda zıt yönde (antiport) de taşıyabilirler (Onat ve ark., 2002).

Zarların iç ve dış kısımlarında yer alan P sınıfı ATP enzimleri protonlarla beraber potasyum taşınımında da işlev görür. Na^+ - K^+ ATPaz enzimi zarın iç ve dış kısmındaki elektrokimyasal farklılığa bağlı olarak iç kısımda fazla bulunan Na^+ iyonlarını hücre dışına, dışarıda yoğun olan K^+ iyonlarını hücre içine pompalar. Na^+ - K^+ ATPaz hücre içerisinde iyonların belirli konsantrasyonda tutulmasına yardımcı olur. Na^+ - K^+ ATPaz yapısal olarak $\alpha_2\beta_2$ alt birimlerinden meydana gelir ve α alt birimi ATP'nin hidrolizini sağlar (Öztaş, 2000). Hücre içerisinde K^+ iyon konsantrasyonunun yüksek Na^+ iyon konsantrasyonunun düşük tutulması Na^+ - K^+ ATPaz sistemi tarafından sağlanmaktadır. Elektriksel gradyente karşı Na^+ ve K^+ iyonlarının kendiliğinden hareketi ATP kullanımıyla olur. ATP'nin ADP ye dönüşümü sonucu 2 K^+ iyonu içeri hareket ederken 3 Na^+ iyonu dışarı atılır. Ouabin Na^+ - K^+ ATP az enzim sistemini inhibe eden steroid türevli bir toksindir (Lehninger ve ark., 2005). Zarda bulunan diğer bir enzim sistemi de Ca^{+2} ATPaz olup, bu enzim Ca^{+2} iyonlarını sitozolün dışına pompalar. Bu şekilde hücrelerdeki Ca^{+2} konsantrasyonunun azaltılmasını sağlar (Öztaş, 2000).

2.6.1. Eritrositlerin Membran Yapısı ve Fonksiyonları

Eritrosit mebranında çeşitli lipid türleri, proteinler ve mükopolisakkaritler (glikoproteinler) bulunur. Kolaylıkla saf olarak elde edilmeleri, vücudun diğer hücrelerine nazaran daha fazla incelenmesine neden olmuştur. Eritrosit mebranı içerik bakımından; % 50 protein, % 40 lipid (fosfolipid, kolesterol, glikolipid) ve % 10 karbonhidrattan ibaret olup, membranın ikili lipid tabakası içine gömülü olan integral proteinler ve sitoplazmik yüzeyle ilişkili olan periferik proteinler eritrosit membranın iskeletini oluşturur (Junqueira ve ark., 1998).

Mathews ve Holde (1996) tarafından belirtildiğine göre; eritrosit membranı, dimerik yapıda 3,89 kilodaltonluk anyonik bir protein içerir ve bu protein zarda bir

anyon kanalı meydana getirerek HCO_3^- ve Cl^- iyonlarının membran boyunca geçişinde ve karbondioksitin hemoglobinle taşınmasında etkin rol oynamaktadır (Uslu, 2006).

Eritrosit membranında diğer önemli bir protein glikoproteinler olup, bu proteinlerden glikoporin A ve B hücrel reseptör olarak, glikoporin C ise membrandaki dimerik bir proteinin band 4.1 ile bağlantı kurar. Normal eritrositler, ortalama yarıçapları 8 μm , kalınlıkları en kenar bölgelerinde 2 μm ve merkezde 1 μm çapında bikonkav disk şeklinde oldukları belirtilmiştir (Guyton, 1986). Alyuvarlar, bikonkav şekilleri sayesinde oksijen taşınımı için daha geniş bir yüzeye sahip olup, bu bikonkav yapıları dar kapillerleri geçmesinde esneklik kazandırmaktadır (Mılan ve ark., 2004).

Memeliler dışındaki canlıların alyuvarları çekirdekli olup, memelilerde ise olgun alyuvarlar çekirdeksizdir. Kan hücreleri kemik iliğinde yapıldıktan sonra kana verilirler. Kana verilen bu hücreler ribozom ve mitokondri gibi organellerle birlikte bazı enzimler içerir (Sağlam 2001). Kanda bulunan bu genç hücrelere retikülosit adı verilir. Bu hücreler yaklaşık bir ya da iki gün içerisinde sitoplazmik organellerini ve birçok enzimlerini kaybederler ve böylece sitoplâzmaya daha fazla hemoglobin doldurabilirler (Sağlam, 2001).

Hemoglobin demir içeren bir protein olup, alyuvarların % 33'ünü oluşturur gerisi sudur. Sitoplâzmadaki, az miktarda olmak üzere, daha başka proteinler, lipidler, inorganik maddeler (K^+ , Mg^{+2}) ve alyuvarların fonksiyonu bakımından çok önem taşıyan karbonhidraz enzimi de bulunur. Bu enzim katalizörlüğünde karbondioksitin büyük bir kısmı hücrelerden atılır. Alyuvarlarla, dokulardan akciğere taşınan CO_2 'nin % 70'inin bikarbonat formunda, geriye kalan % 15'inin ise CO_2 ' in hemoglobinle oluşturduğu karbaminohemoglobin şeklinde taşındığı ileri sürülmüştür (Sağlam, 2001).

Erkek ve kadında eritrosit miktarı farklı olup sırasıyla erkekte 5.4×10^6 ve kadında 4.8×10^6 olarak değişmektedir ve ortalama yaşam süreleri 120 ± 20 gündür (Mılan ve ark., 2004)

Eritrositler kolaylaştırılmış difüzyon sistemlerinden başka sistemler de içerir. Anyon değişimi karaciğer, iskelet kası gibi organlardan akciğerlere CO_2 taşınımında gereklidir. Anyon değişim proteini eritrosit membranının bikarbonata (HCO_3^-) geçirgenliğini daha çok artırır. Klor (Cl^-) ve bikarbonat (HCO_3^-) anyonlarının zardaki

hareketi bu proteinler aracılığıyla olmaktadır. Bu iki iyon mecburen zıt yönlü hareket etmek zorunda olup, Cl^- yokluğunda HCO_3^- taşınımı durur (Lehninger ve ark., 2005).

2.7. Memeli Hücrelerinde Amino Asit Transport Sistemleri

Memeli hücrelerinde farklı substrat spesifitesine sahip amino asit transport sistemleri tanımlanmış ve bunların genel özellikleri açıklanmıştır. Bu özellikler, stereospesifite (transport L-steroisomer için daha hızlıdır) ve geniş substrat spesifitesi (bir çok amino asit bir transport sistemini paylaşır). Amino asit transportunun asıl fonksiyonunun belirlenmesinde amino asidin tipi (asidik, bazik, zwitterionic), transportun termodinamik özellikleri önemli kriter olarak kabul edilmiştir (Palacın ve ark., 1998).

Yapılan fonksiyonel çalışmalar, transportun doygunluğunu, substrat spesifitesini, kinetik hareketini, enerji kullanımını, çeşitli organlardaki regülasyon mekanizmalarını temel alarak, izole edilmiş hücreler ve saflaştırılmış plazma membranlarında yapılan çalışmalar sonucu memeli hücrelerinin plazma membranlarında çok sayıda transport sistemi tespit edilmiştir (Christensen ve ark., 1965). Bu çalışmalardan sonra farklı amino asitlerin belirli bir transport sistemiyle taşındığı ve bu amino asit transport sistemlerin kısmi spesifite gösterdiği saptanmıştır. Çeşitli hücreler plazma membranlarında yaygın olan (örneğin: A, ASC, L, y^+ ve X_{AG} sistemler) transport sistemlerin farklı bir setini ve dokuya özgü transport sistemleri (örneğin, B^{o+} , N^m , ve b^{o+} genel transport sistemlerinin farklı şekilleri gibi) içerir (Palacın ve ark., 1998)

2.7.1. Zwitteriyonik Amino Asitler için Genel Transport Sistemler

Zwitteriyonik amino asit transport sistemleri A; ASC, ve L bütün hücrelerde daima mevcuttur. Sistem A ve ASC küçük zincirli amino asitlerin sodyumla aynı yönlü (simport: memelilerde Na^+ ile birlikte amino asit taşınımı) taşınmasına ve sistem L büyük zincirli amino asitlerin tek yönlü olarak taşınmasına aracılık eder (Palacın ve

ark., 1998). Sistem L çok değişken bir özelliğe (trans-stümüasyon gösterir) sahip olup, pek çok durumda amino asitlerin hücrelere girişlerinden çok çıkışlarına aracılık ettiği varsayılmaktadır.

Sistem A için tercih edilen substratlar alanin, serin ve glutamin, sistem ASC için ise alanin, serin ve sisteindir (Christensen ve ark., 1965). Ayrıca, dallanmamış küçük yan zincirli amino asitler sistem L için düşük kaliteli substratlar iken analogları için (2-aminoendobisiklo-heptan-2-karboksilik asit ve 3-aminoendobisiklo-octan-3-karboksilik asit) sodyum yokluğunda model substratlar olarak kabul edilmektedir. Sistem L nin L1 ve L2 olmak üzere iki alt tipi mevcuttur. Bunlar farklı yaşlarda hepatosit ve hepatoma hücrelerinde bulunurlar. Böylece zwitteriyonik amino asitler pek çok hücrede Na^+ ile birlikte taşınmaz. Bu epitel hücrelerinde de farklıdır. Epitel hücrelerinde geniş substrat spesifiteli sistemler (örneğin; $B^0, B^{0,+}$) sodyumun elektriksel gradyentine bağlı olarak bu amino asitleri toplarlar. N-metillenmiş amino asitlerin transportu sistem A nın ayırımı için önemli bir ölçüttür. Sodyuma bağlı alanin transportunun N-metilaminobütrik asit tarafından inhibisyonu sistem A aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Sistem A ve ASC farklı özelliklere sahiptirler. Sistem A elektrojeniktir ve trans-inhibisyon özeliği gösterir. Sistem ASC elektronötral olabilir ve trans-stimulasyon özeliği gösterir (Guidotti ve Gazzola, 1992). Ayrıca, Sistem A yüksek pH'a duyarlıyken sistem ASC kısmen duyarlıdır. Sistem A'nın önemli bir ayırıcı özeliği pek çok hücre tipinde aktivitesi düzenlenir. Glukagon ve epidermal büyüme faktör hepatositlerde kısa süreli sistem A'yı sitümüle eder.

Bunların dışında dokuya özgü zwitteriyonik amino asitler tanımlanmıştır. L-glutamin, L-histidin ve L-asparjin amin asitlerinin hepatositlere transportunun N adı verilen sodyuma bağlı transport sistemi yoluyla olduğu kanıtlanmıştır. Sistem A'ya benzer özellikte sistem N iskelet kaslarında keşfedilmiş olup, N^m olarak adlandırılmıştır. Sistem Gly, glisin ve sarkozin için özel olup, birçok hücre tipinde bulunur. Sodyum ve klor bağlı GLYT1 ve GLYT2 nörotransmitter taşıyıcıları sistem Gly'in varyantları olarak tanımlanmaktadır. Sistem BETA; β -alanin, taurine ve GABA için çok özel bir transport sistemi olup birçok dokuda tanımlanmıştır ve farklı substrat affinitesi ve spesifitesi gösterir. Sodyum ve klora bağlı nörotransmitter transportlara ait GAT1-3, BGT-1 ve TAUT sistem BETA'nın varyantları olarak düşünölmektedir.

Epitel hücrelerin apikal kısımlarına özgü çeşitli zwitteriyonik transport sistemleri tanımlanmıştır. Bağırsak fırçası kenar hücrelerinin membranlarında nötral amino asitlerin taşınımına aracılık eden sodyuma bağlı bir transport sistem tanımlanmıştır (Palacın ve ark., 1998). Bu sistem önce NBB olarak adlandırılmış daha sonra geniş spesifiteli sistemlere (B^{0+} , b^{0+} , b^+) uygunluğu nedeniyle sistem B olarak yeniden adlandırılmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, sığırların böbrek fırçası kenar hücrelerinin membranlarında nötral amino asitlerin sodyuma bağlı transportunu gerçekleştiren bir sistem keşfedilmiş ve bu sistem B^0 olarak adlandırılmıştır. Bu geniş spesifiteli sistemler, zwitteriyonik amino asitlerin bağırsaklarda emiliminden ve böbreklerde geri emilimlerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir. Sistem IMINO, böbrek, barsak ve epitel hücrelerinde keşfedilmiş olup, prolin, hidroksi prolin, N-metil glisin gibi amino asitlerin sodyuma bağlı transportunu katalizler.

2.7.2. Katyonik Amino Asit Transport Sistemleri

Katyonik amino asitlerin alınmasına aracılık eden beş adet transport sistemi bilinmektedir. Bunlardan geniş bir yayılma gösteren sistem y^+ 1980'lerin sonlarına doğru diğer dördü ise 1990'ların başlarında keşfedilmiştir.

Bu sistemlerin aktiviteleri, zwitteriyonik amino asitlerle paylaşım kapasitelerine ve sodyuma bağlılıkları ile katyonik amino asitlere karşı olan affinitelerine göre ayırt edilmektedir. Sistem y^+ yüksek affiniteli katyonik amino asitlerle düşük affiniteli zwitteriyonik amino asitlerin sodyum varlığında transportunu kolaylaştırır. Sistem y^+L insan eritrositlerinde keşfedilmiş olup, ayrıca plasentada da tanımlanmıştır. Sistem y^+L farklı dokular arasında yaygın bir dağılıma gösterir. Bundan dolayı insan fibroblastlarında da tespit edilmiştir (Palacın ve ark., 1998).

Bu sistem katyonik amino asitleri hücre dışı ortamda sodyuma gereksinim duymadan yüksek affinite ile transport ederken, ancak; küçük ve büyük zwitteriyonik amino asitleri sodyum varlığında yüksek affinite ile sodyum yokluğunda ise düşük affinite ile transport etmektedir. Sistem y^+ ve y^+L aktiviteleri N-etilmaleimid ile muamele edilen plasenta ve eritrositlerde ayırt edilebilmektedir. Sistem y ve y^+L çok

yüksek trans stimülasyon kapasitesi gösterir. Sistem y^+ katyonik amino asitlerin plazma membranından giriş çıkışını dengeler.

Bir çok çalışma grubu, oositlerde 4F2hc yüzey antijeni ile sistem y^+L transport aktivitesini tespit etmişlerdir (Ruiz ve ark., 2002). Sistem $B^{0,+}$, $b^{0,+}$, ve b^+ fare blastosistlerinde keşfedilmiştir. Bu sistemler arasında sadece embriyonik sodyumdan bağımsız sistem b^+ katyonik amino asitler için transport aktivitesine sahiptir (Palacın ve ark., 1998).

Sistem $B^{0,+}$ ve $b^{0,+}$ katyonik ve zwitteriyonik amino asitler için yüksek affiniteli geniş bir spesifite gösterir. Sistem $b^{0,+}$ mutasyonları sistin ve katyonik amino asitlerin bağırsaklardan emilimi ve böbreklerde hatalı geri emilimden dolayı kalıtsal hiperomino asitüriye neden olmaktadır.

2.7.3. Anyonik Amino Asit Transport Sistemleri:

Pek çok hücrede biriktirilen (nöronlar ve glial hücreler, hepatositler, enterositler, fibroblastlar ve plasenta trofoblastları) L-glutamat ve L-aspartat yüksek affiniteli sodyum ve potasyuma bağlı sistem X_{AG}^- tarafından transport edilir (Palacın ve ark., 1998). Bu sistem aspartatın D ve L-steroizomeri için belirli bir affinite gösterir. Sinir dokularında bu transport sistemlerin varyantları mevcuttur. Çeşitli hücre tipleri (hepatositler, fibroblastlar ve embriyonik hücreler) L-glutamat ve L-sistini sodyumdan bağımsız X_C^- antiport sistem aracılığıyla transport ederler. Bu sistem 100–200 μM oranında bir K_M değerine sahip olup, trans sitümülasyon özeliği gösterir ve membran potansiyeline duyarlıdır (Guidotti ve Gazzola, 1992). Bu sistem glutamin sistin döngüsüne katılır ve oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasına yardımcı olur. Glutamin sistem ASC ve A aracılığıyla hücreye girer ve glutamata dönüşür. Bu şekilde oksidatif stresin indüklediği X_C^- yoluyla hücrelerin oksidatif hasardan korunması ve glutatyon sentezinin desteklenmesi için gerekli sistin giriş çıkışını sağlar.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

L-sistein, L-glutamin, azaserin (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A). 5,5'-dithiobis (-nitrobenzoate) (DTNB) Fluka Bio Chemica (Switzerland). Deneylerde kullanılan kan, Antakya Devlet Hastanesi kan bankasından, sağlıklı vericilerden 300 ml'lik üniteler şeklinde elde edilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümler için, Shimatzu 1200 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Eritrositlerin Hazırlanışı

Sağlıklı insanlardan elde edilen heparinize insan kanı, 2500 g'de 5 dakika santrüfjü edilerek plazma eritrositlerden ayrılmış ve uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin ardından, geriye kalan eritrosit yığına iki hacim 8 mM glikoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponuyla (9 kısım 0.15 M NaCl ve 1 kısım 0.1 M potasyum fosfat tamponu) üç kez yıkılarak deneylerde kullanıma hazır hale getirilmiştir.

DENEY 1:

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. Potasyum fosfat tuz tamponu (9 kısım 0.15 M NaCl, 1 kısım 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH: 7.4)
2. Krebs ringer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM Glikoz (C₆H₁₂O₆), 10mM NaH₂PO₄, pH: 7.4)

3. 10 ml hacimde 1 mM'lık, 2.5 mM'lık ve 5 mM'lık L-sistein içeren Krebs ringer pH: 7.4
4. 0,01 M sodyum fosfat/ 0,005 M EDTA tamponunda hazırlanmış % 10'luk TCA (Trikloroasetik asit) 100 ml
5. 2 ml, 0,6 µmol / ml DTNB (2.5 ml metanolde çözülmüş)
6. Tris EDTA tamponu (pH: 8.9)

DENEY 2:

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glikoz içeren potasyum fosfat tuz tamponu (PBS-tamponu)
2. 10 ml hacimde 1mM'lık, 2.5 mM'lık ve 5 mM'lık L-sistein içeren Krebs ringer tamponu,(pH: 7.4)
3. 2 ml, 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate) 2,5ml (metanolde çözülmüş halde)
4. Tris ETDA tamponu (pH: 8.2)

DENEY 3:

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glikoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (PBS-tamponu)
2. 10 ml 2,5 mM L-sistein içeren Krebs ringer tamponu (pH 7.4)
3. 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, azaserin içeren Krebs ringer tamponu (pH 7.4)
4. % 10'luk 100 ml TCA (Trikloroasetik asit)
5. Tris EDTA tamponu (pH 8.9)
6. 2ml 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate)

DENEY 4:

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları

1. 8 mM glikoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu
2. 10 ml 2,5 mM L-sistein içeren Krebs ringer tamponu
3. 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, azaserine içeren Krebs ringer tamponu
4. Tris ETDA tamponu (pH 8.2)
5. 2 ml 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'Dithiobis(-nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde çözülmüş

DENEY 5:

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları

1. 8 mM glukoz içeren potasyum fosfat tuz tamponu (PBS, pH 7.4)
2. 2 mM azaserin içeren Krebs ringer tamponu (pH: 7.4)
3. 2,5 mM L-sistein içeren Krebs ringer tamponu (pH 7.4)
4. Tris EDTA tamponu (pH 8.9)
5. 2 ml 0,6 µmol/ml DTNB (5,5'Dithiobis(-nitrobenzoate))

DENEY 6:

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve oranları:

1. 8 mM glikoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 10 ml 2.5 mM L-sistein içeren Krebs ringer (pH 7.4)
3. 2 mM L-glutamin içeren Krebs ringer (pH 7.4)
4. Tris ETDA tamponu (pH 8.9)
5. % 10'luk 100 ml TCA (Trikloroasetik asit)

6. 2ml 0,6 $\mu\text{mol/ml}$ DTNB (5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde $\text{}z\text{}nm\text{}ş$

DENEY 7:

$\text{}alışmada kullanılan $\text{}ozeltiller ve oranları:$$

1. 8 mM glikoz içeren potasyum-fosfat-tuz tamponu (pH 7.4)
2. 10 ml 2,5 mM L-sistein içeren Krebs ringer (pH 7.4)
3. 2 mM L-glutamin içeren Krebs ringer (pH 7.4)
4. 2 ml 0,6 $\mu\text{mol/ml}$ DTNB (5,5'-Dithiobis (-nitrobenzoate)) 2.5 ml metanolde $\text{}z\text{}nm\text{}ş$

3.2.Yöntem

Araştırmamız, yedi deney aşamasından oluşmaktadır.

- 1 Deney 1 'de zaman sabit tutularak farklı konsantrasyonlarda L-sistein ile muamele edilen eritrositlerde hücre içerisine L-sistein girişi değerlendirilmiştir.
- 2 Deney 2' de farklı konsantrasyonlarda L-sisteinle muamele edilen eritrositlerde L-sistein $\text{}ıkışı incelenmiştir.$
- 3 Deney 3'de L-sistein konsantrasyonu ve zaman sabit tutularak azaserinin farklı konsantrasyonlarda hücelere L-sistein girişini nasıl etkilediği amaçlanmıştır.
- 4 Deney 4'de L-sistein konsantrasyonu sabit tutulup, azaserinin değişik konsantrasyonlarda eritrositlerden L-sistein $\text{}ıkışını nasıl etkilediği amaçlanmıştır.$
- 5 Deney 5'de L-sistein konsantrasyonu ve azaserin konsantrasyonu sabit tutularak azaserinle ön muamele edilen eritrositlerde, azaserinin geri dönüşümlü etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.
- 6 Deney 6'da eritrositler 2,5 mM L-sistein ve 2 mM L-glutamin ile muamele edilerek glutaminin sistein girişi üzerine etkisi incelenmiştir.
- 7 Deney 7'de L-sistein konsantrasyonu sabit tutularak inkübe edilen eritrositler 2 mM L-glutamin ile muamele edilerek eritrositlerden L-sistein $\text{}ıkışına glutaminin etkisi ölçölmüştür.$

DENEY 1: Eritrositlerde L-Sistein Girişinin Gösterilmesi

Deneylede sağlıklı vericilerden elde edilen heparinize insan kanı kullanıldı. Kan, potasyum fosfat-tuz tamponu (9 kısım 0,15 M NaCl 1kısım 0,1 M potasyum fosfat, 8 mM glikoz, pH 7.4) ile üç kez yıkanarak hazırlandı.

Bu işlemden sonra içinde 1 mM, 2,5 mM ve 5 mM L-sistein içeren Krebs ringer tamponlarından 500 µl, hazırlanmış eritrosit stokundan 250 µl alınarak endorf tüplere ilave edildi. Kontrol grubu olarak 500 µl Krebs ringer tamponu ve 250 µl kan içeren endorf tüpler kullanıldı. Kontrol grubu hiçbir şekilde L-sistein ile kontamine edilmedi. Tüm bu işlemlerden sonra deney ve kontrol grupları 37 °C 'de 1 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon işleminden sonra eritrositler 5 dakika (d) 2500 g.' de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra deney ve kontrol grupları 1000 µl potasyum fosfat tuz tamponuyla birkez yıkandı. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Geriye kalan eritrosit stoku 250 µl % 10'luk TCA ile muamele edildi. TCA, hücre membranını parçaladığından proteinleri ve bu pH da çözünebilen bütün her şeyi çöktüğünden dolayı geriye sadece eritrositlerde serbest -SH grupları kalacaktır. Parçalanmış eritrositler 10.000 g' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjleme işleminden sonra süpernatant kısmından 100µl alınarak 1850 µl Tris-EDTA tamponu (pH 8.9) ve 50 µl 5,5'Dithiobis -nitrobenzoate (DTNB) içeren karışım üzerine ilave edildi. Kör olarak 1900 µl Tris EDTA tamponu ve DTNB'siz 100 µl kontrol süpernatantı kullanıldı.

Daha sonra serbes -SH grupları Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından belirlenen metoda uygun olarak ölçüldü. Spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri eritrositlerdeki serbes -SH miktarının hesaplanması için değerlendirildi.

DENEY 2: Eritrositlerden L-Sistein Çıkışı

Eritrositler PBS-glukoz tamponuyla (pH 7,4) yıkanarak hazırlandı. Hazırlanan eritrosit stokundan 250 µl alınarak endorflara aktarıldı. Kontrol grubuna krebs ringer,

deney gruplarına 1 mM, 2,5 mM, 5 mM L-sistein içeren krebs ringer tamponundan (pH 7,4) 500'er µl alınarak ependorflara aktararak yavaşça karıştırıldı. Bu işlemlerin ardından deney ve kontrol grupları 1 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminden sonra deney ve kontrol grupları 5 d 2500 g' da santrifüj edildi. İşlem sonunda üste kalan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Deney ve kontrol grupları birkez 1000 µl PBS tamponuyla yıkandı ve ardından 5 d 2500 g'de santrifüj edildi. Daha sonra deney ve kontrol grupları 500 µl krebs ringerle muamele edilerek 1 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüm gruplar 5 d 2500 g'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200'er µl temiz tüplere alındı. Üzerlerine 1750 µl Tris EDTA tamponu (pH 8.2) ve 50 µl DTNB ilave edildi.

Kör olarak 1800 µl Tris EDTA tamponu ve DTNB'siz 200 µl kontrol süpernatantı kullanıldı. Renk değişimiyle beraber 410 nm'de ölçülen absorban değerleri –SH konsantrasyonlarının hesaplanması için kullanıldı.

DENEY 3: Eritrositlere L-Sistein Girişine Azaserinin Etkisi

PBS-glukoz tamponuyla hazırlanan eritrosit stokundan 250'er µl alınarak ependorflara aktarıldı. İlk gruba yalnız krebs ringer tamponu, ikinci gruba 2,5 mM sistein içeren krebs ringer tamponu ve 3, 4, 5, 6 ncı deney gruplarına 2,5 mM sistein ve 0,25 mM, 05 mM, 1 mM, 2 mM azaserin içeren krebs ringer tamponundan ependorflara alınarak yavaşça karıştırıldı. Bu işlemin ardından 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 2500 g' de 5 d santrifüj edilerek üste kalan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Deney ve kontrol grupları 1000 µl PBS-glukoz tamponuyla birkez yıkandı. Yıkanan eritrositler 250 µl % 10'luk TCA ile muamele edildi. TCA ile parçalanmış eritrositler 10000 g' de 5 d santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında oluşan süpernatantın 100 µl alınıp üzerine 1850 µl Tris-EDTA tamponu (pH 8.9) ve 50 µl DTNB eklendi. Örnekler kısa bir süre renk değişimi için bırakıldı renk değişiminden sonra 410 nm'de ölçülen absorban değerleri serbest –SH konsantrasyonlarının hesaplanması için kullanıldı.

DENEY 4: Eritrositlerden L-Sistein Çıkışına Azaserinin Etkisi

Eritrositler üç hacim PBS-glukoz tamponuyla yıkanarak hazırlandı. Eritrosit stokundan her deney grubu için 250 µl endodorflara eklenerek; kontrol grubuna sadece krebs ringer, diğer gruplara 2,5 mM sistein içeren krebs ringer tamponundan 500'er µl eklenerek yavaşça karıştırıldı. Bu işlemlerden sonra bir saat 37 °C inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Eritrositler bir defa PBS tamponuyla (pH 7.4) yıkandı. Daha sonra kontrol gruplarına sadece krebs ringer deney gruplarına 0,25 mM 0,5 mM, 1mM ve 2 mM azaserin içeren krebs ringer çözeltilerinden 500'er µl eklenerek yavaşça karıştırıldı. Eritrositler 1 saat 37 °C inkübasyona bırakıldı. İşlem sonunda eritrositler 5 d 2500 g' de santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant 200'er µl alınarak temiz tüplere aktarıldı. Üzerlerine Tris EDTA (pH 8.2) tamponundan 1750 µl ve 50 µl DTNB ilave edildi. Kör olarak kontrol grubundan 200 µl süpernatant ve 1800 µl Tris EDTA tamponu (pH 8.2) kullanıldı. Renk değişiminden sonra 410 nm'de ölçülen absorban değerleri serbes-SH konsantrasyonlarının hesaplanması için kullanıldı.

DENEY 5: Azaserinin L-Sistein Transportu üzerine Geri Dönüşümlü Etkisi

PBS-glukoz tamponuyla yıkanarak hazırlanan eritrosit stokundan 250 µl alınarak endodorflara ilave edildi. Üç gruptan oluşan deneyde birinci ve ikinci gruplara sadece krebs ringer, üçüncü gruba 2 mM azaserin içeren krebs ringer tamponundan 500 µl ilave edilerek karıştırıldı. Bu işlem sonunda deney ve kontrol grupları 5 saat 37 °C de inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonunda 2500 g' de 5 d santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Deney ve kontrol grupları 1000 µl PBS tamponuyla (pH 7.4) iki defa yıkandı. Yıkanan eritrositler üzerine ilk gruba yalnızca krebs ringer ikinci ve üçüncü gruplara 2,5 mM L-sistein içeren krebs ringer tamponu (pH 7.4) ilave edilerek 1 saat 37 °C inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra deney ve kontrol grupları 1000 µl PBS tamponuyla bir defa yıkanarak süpernatant uzaklaştırıldı. Yıkanan eritrositler % 10'luk TCA ile muamele edilerek parçalandı. Bundan sonra 10.000 g' de 5 d santrifüj

edildi. Süpernatant kısmından 100 µl alınarak temiz tüplere aktarıldı. Üzerine 1850 µl Tris EDTA tamponu ve 50 µl DTNB ilave edildi. Karışımda renk değişimi sağlandıktan sonra 410 nm de ölçülen absorbans değerleri serbest -SH konsantrasyonlarının hesaplanılmasında kullanıldı.

DENEY 6: Glutaminin L-Sistein Girişi Üzerine Etkisi

Üç hacim PBS-glukoz ile yıkanmış eritrosit stokundan 250'er µl alınarak ependorflara ilave edildi. Üzerlerine 1. gruba krebs ringer tamponu 2.gruba 2,5 mM sistein ve 3.gruba 2,5 mM sistein ve 2 mM glutamin içeren krebs ringer tamponundan 500'er µl ilave edilerek karıştırıldı. Bu işlemler sonunda 1 saat 37 °C inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 5 d 2500 g' de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Eritrositler bir defa 1000 µl PBS-glukoz ile yıkandı. Yıkanan eritrositler 250 µl % 10'luk TCA ile muamele edildi.. TCA ile eritrositler parçalandıktan sonra 10.000 g' de 5 d santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra süpernatantan 100 µl alınarak içerisinde 1850 µl Tris-EDTA tamponu (pH 8.9) ve 50 µl DTNB içeren temiz tüplere aktarıldı. Renk değişiminden sonra 410 nm de ölçülen absorbans değerleri serbes-SH konsantrasyonlarının hesaplanması için kullanıldı.

DENEY 7:Glutaminin L-sistein Çıkışı Üzerine Etkisi

Üç hacim PBS-glukoz tamponuyla yıkanan eritrosit stokundan 250 µl alınarak ependorflara aktarıldı. Kontrol grubuna sadece krebs ringer tamponu (pH 7,4) ve deney gruplarına 2,5 mM sitein içeren krebs ringer tamponundan 500 µl ilave edilerek karıştırıldı. Bu işlemler sonunda 1 saat 37 °C inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 2500 g' de 5 d santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Eritrositler bir defa 1000 µl PBS-glukoz tamponuyla yıkandı. Bu işlemin ardından ilk ve ikinci gruba sadece krebs ringer 3. gruba 2 mM glutamin içeren krebs ringer tamponundan 500'er µl eklenerek hafifçe karıştırıldı. Gruplar 1 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra 2500 g' de 5 d santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µl alınarak 1750 µl Tris EDTA ve 50 µl DTNB içeren tüplere ilave edildi. Kör olarak DTNB'siz kontrol grubundan 200 µl süpernatant ve 1800 µl Tris EDTA tamponu (pH 8.2) kullanıldı. Renk değişiminin ardından absorbans değerleri 410 nm de ölçülerek elde edilen değerler serbes -SH konsantrasyonlarının hesaplanması için kullanıldı.

3.2.1. İstatiksel Analizler

Çalışmamızda student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırma ve tek yönlü değişim analizi kullanılmıştır. Testler, istatistiksel yöntemlere dayalı olarak yürütülmüştür. Bütün testlere üçer örnek uygulanmıştır. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması alınarak gösterilmiştir. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Sistein'in eritrositlere girişi ile ilgili çalışmanın sonucu Şekil.4.1'de gösterilmektedir. Sonuçlar eritrositlerin, sisteini konsantrasyona bağlı bir şekilde aldıklarını göstermektedir. Eritrositlerin inkübe edildiği ortamdaki sistein konsantrasyonu arttıkça eritrositlere sistein girişi de artmaktadır. 1 mM, 2,5 mM ve 5 mM sistein ile inkübe edilen eritrositlerdeki serbest -SH değerleri kontrolden istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olarak ölçülmüştür. Ancak eritrositlerdeki serbest -SH değerleri bir saatten sonra sabitlenmektedir. Çünkü eritrositler aynı konsantrasyonda sistein ile iki saat inkübe edildikten sonra serbest -SH değerleri ölçüldüğünde, bir ve iki saatlik sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuçlar eritrositlere sistein girişinin bir saatte maksimum düzeye ulaştığını göstermektedir. Sonuçlar eritrositlerin sistein konsantrasyonu arttığında bu amino asidi ortamdaki aldıklarını göstermektedir.

Daha sonraki bir adımda eritrositlerin ortamdaki aldıkları sisteini tekrar ortama verip vermedikleri gösterilmeye çalışılmıştır. Bu amaç için eritrositler, önce sisteinle muamele edildi. Daha sonra bu eritrositler sistein içermeyen krebs tampona transfer edilerek bir saat ve iki saat inkübe edildi ve ortamda serbest -SH değerleri ölçüldü. Şekil 4.2'de gösterilen sonuçlar konsantrasyona bağlı olarak eritrositlerin hücre dışına sistein transportunun arttığını ve yine bir saatte sistein'in dışa transportun maksimum düzeye ulaştığını göstermektedir. Eritrositlerle yaptığımız çalışmadaki sonuçlarımız, eritrositlerin sistein konsantrasyonu arttığı zaman bu amino asidi ortamdaki aldıklarını ve daha sonra dış ortamdaki sistein konsantrasyonu azalmasıyla sisteini tekrar hücre dışı ortama verdiklerini göstermektedir.

Daha sonraki çalışmalarda azaserinin sistein girişi üzerinde bir etki meydana getirip getirmediğini tespit etmeye çalıştık. Deneylerde doğrudan kanserojen etkisi belinen azaserini kullandık. Sistein konsantrasyonu 2,5 mM da sabit tutularak, azaserin'in 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarıyla bir saat inkübe edilen eritrositlerde serbest -SH değerleri ölçüldü. Azaserin ile bir saat inkübe edilen eritrositlerde ölçülen serbest -SH değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 2,5 mM sistein grubu ile 2 mM azaserin içeren deney grubu arasında önemli derecede istatistiksel farklılık olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel çalışma sonucu 2 mM

azaserin içeren deney grubunda ölçülen değerlerin sadece 2,5 mM sistein içeren kontrol grubundan önemli derecede farklı olması azaserinin sistein girişi üzerinde bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ancak böylesi bir etki 2 mM azaserin konsantrasyonundan daha düşük konsantrasyonlarında gözlenmedi. Azaserinin 0,25 mM, 0,5 mM ve 1 mM gruplarıyla sadece 2,5 mM sistein içeren deney grubunda ölçülen –SH değerleri kıyaslandığında, bu konsantrasyonlarda azaserinin eritrositlere sistein girişinde bir etki meydana getirmedeği tespit edilmiştir. Şekil 4.3'deki grafik azaserinin sistein girişi üzerine olan etkisini göstermektedir.

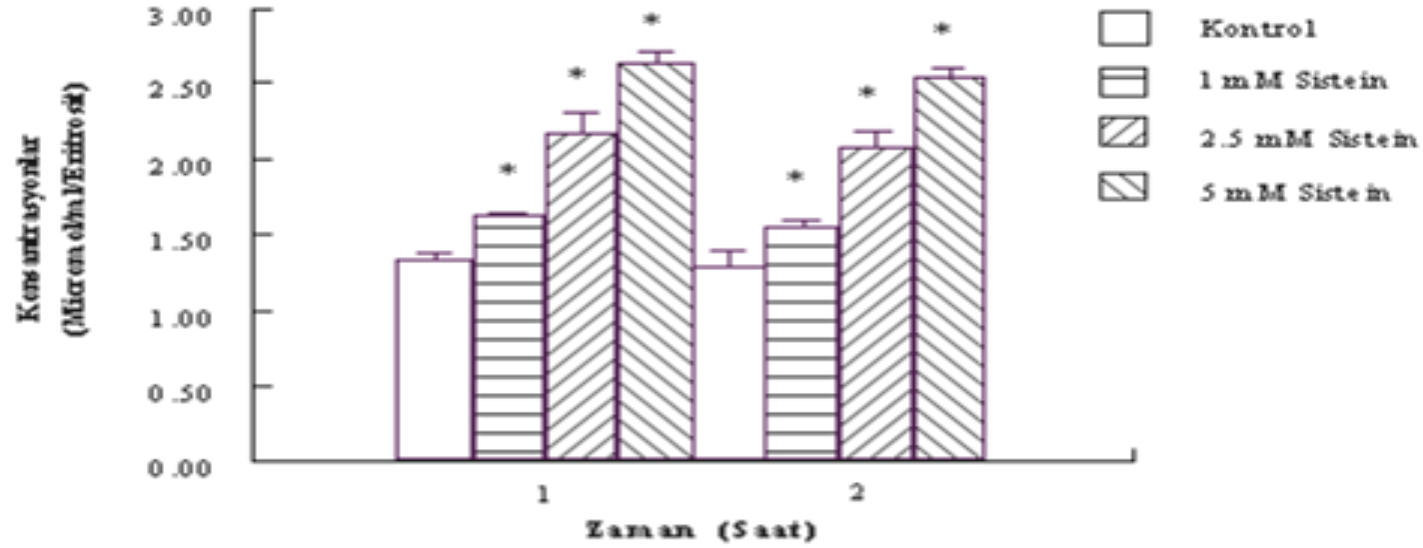
Sonraki adımda eritrositlerin aldıkları sisteini azaserin varlığında tekrar ortama verip vermedikleri saptanmaya çalışıldı. Eritrositler önce sistein ile muamele edilerek bir saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM azaserin içeren sisteinsiz krebs tampona transfer edilerek bir saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda serbest –SH değerleri ölçüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede 0,25 mM azaserin içeren deney grubu ile yalnız 2,5 mM sistein içeren deney grubu arasında bir farklılık olduğu saptanmamıştır. Ancak 0,5 mM, 1 mM ve 2 mM azaserin içeren deney grupları ile sadece 2,5 mM sistein içeren deney grupları arasında serbest –SH grupları kıyaslandığında azaserinin sistein çıkışında 0,5 mM azaserin içeren deney grubundan itibaren eritrositlerin ortamdaki sisteini tekrar ortama geri verdiklerine dair önemli derecede bir farklılık saptanmıştır. Şekil 4.4'deki grafik azaserinin sistein çıkışı üzerine olan etkisini göstermektedir.

Şekil 4.5'de azaserinin sistein girişine geri dönüşümlü etkisini göstermektedir. Eritrositler önce azaserin ile ön muamele edildi. Deney aşamasında birinci ve ikinci gruplar azaserin içermeyen Krebs ringer tamponuyla diğer grup 2 mM azaserinle inkübe edildi. Daha sonra eritrositler yıkanarak kontrol grubu hariç 2 ve 3. deney grupları 2,5 mM sistein içeren Krebs taponuna transfer edildi. 2,5 mM sisteinle inkübe edilen eritrositlerde –SH değerleri ölçüldü. Sadece sistein ile muamele edilen eritrositler ile sadece azaserin ve sistein ile muamele edilen deney grupları arasında yapılan değerlendirme sonucunda sistein girişini azaserinin geri dönüşümsüz olarak etkilediğine dair bir farklılık gözlenmedi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda azaserin ve sistein deney grupları sadece Krebs ringerde inkübe edilen kontrol grubundan farklı olsa da bu iki grup arasında da eritrositlerin ortamdaki sisteini almalarında önemli derecede bir

farklılık olduğu tespit edilemedi. Şekil 4.5 'deki grafik azaserinin sistein girişi üzerine geri dönüşümlü etkisini göstermektedir.

Çalışmamızda azaserinin sistein giriş ve çıkışı üzerindeki etkilerini inceledikten sonra bir sonraki adımda glutaminin sistein giriş ve çıkışı üzerinde etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Üç gruptan oluşan deneyde kontrol grubu dışında kalan son iki deney grubundan birine sadece 2,5 mM sistein diğer gruba 2,5 mM sistein ve 2 mM glutamin içeren krebs ringerdan ilave edilerek bir saat 37 °C inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon işleminden sonra eritrositlerde serbest – SH değerleri ölçüldü. Glutamin grubu ve ve glutamin içermeyen sistein grubu arasında herhangi bir fark tespit edilemedi. Bazı araştırmacılar tarafından azaserin, bir glutamin analogu olarak belirtilmesine rağmen glutamin sistein girişi üzerinde azaserin gibi bir etkiye neden olduğu tespit edilemedi. Şekil 4.6'daki sonuçlar eritrositlere sistein girişi üzerine glutaminin etkisini göstermektedir.

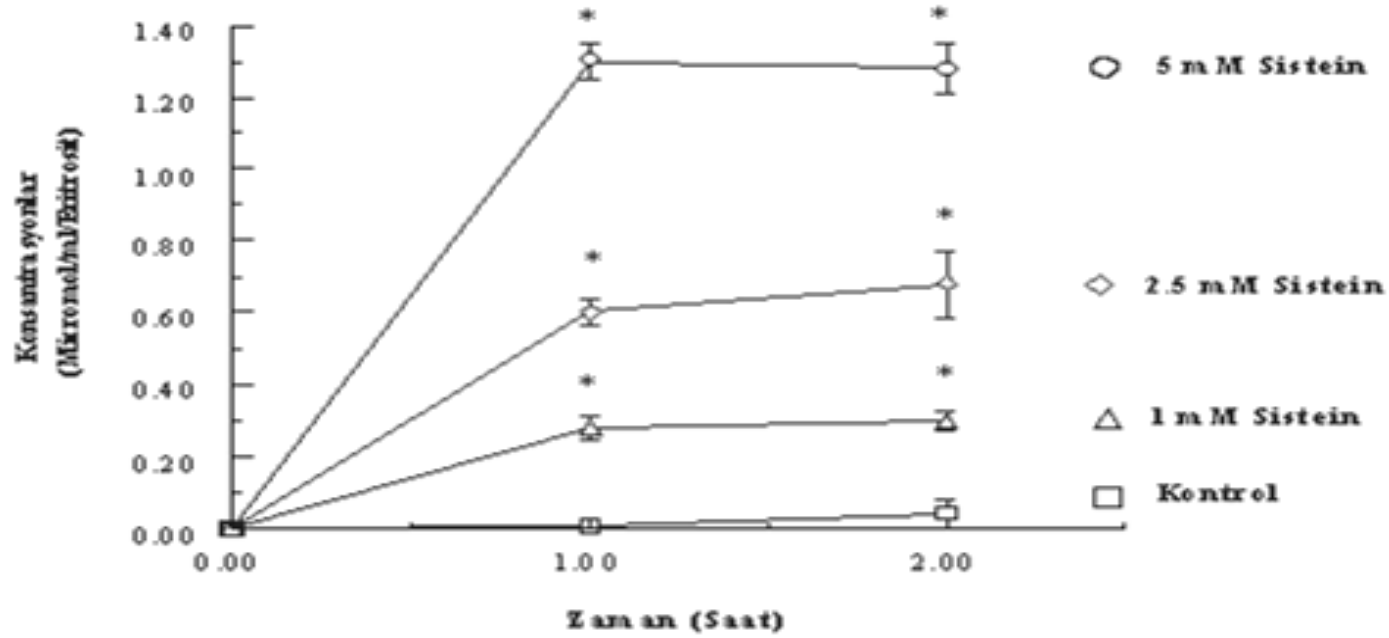
Eritrositlere sistein girişi üzerine glutaminin bir etkisi gözlenmediğinden sonraki adımda deneylerde sistein çıkışı üzerine glutaminin bir etkisinin olup olmadığını araştırdık. Bunun için deney grupları, önce 2,5 mM sisteinle muamele edip 1 saat 37 °C inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bir ve ikinci gruplar sadece krebs ringer tamponuna üçüncü deney grubu ise 2 mM glutamin içeren krebs ringer tamponuna transfer edilerek bir saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ölçülen serbes –SH değerlerinde 2 mM glutamin içeren deney grubunda kontrolden önemli derecede farklılık olduğu saptandı. Şekil 4.7'deki sonuçlar, glutamin ile muamele edilen eritrositlerde glutaminin sistein çıkışı üzerine olan etkisini göstermektedir. Glutaminin sistein çıkışında etki göstermesi bu amino asidin membranda işlev gören antiport sistem aracılığıyla hücre içerisine alınırken aynı zamanda sisteini de hücre dışına transfer edebileceğini düşündürmektedir.



Şekil.4. 1. Eritrositler tarafından sistein alımı: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda sistein varlığında bir ve iki saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eritrositler yıkandı ve eritrositlerde serbes -SH değerleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0,05$

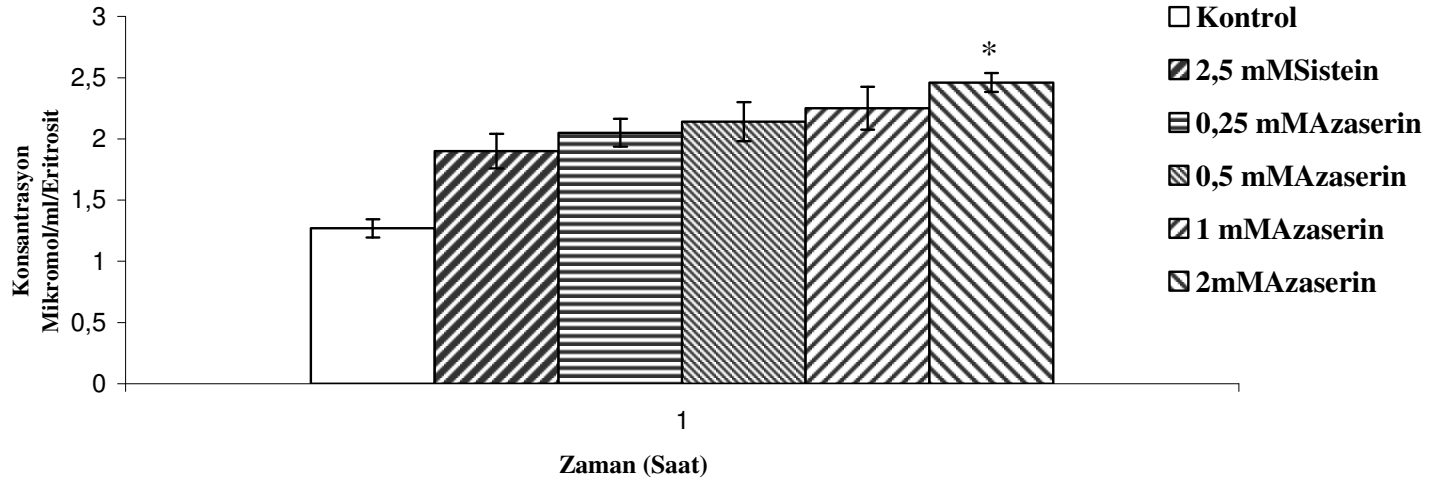
* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer.



Şekil.4. 2. Eritrositlerden sistein çıkışı: Eritrositler farklı konsantrasyonlarda sistein ile önce bir saat inkübe edildi. Sonra eritrositler yıkandı ve krebs tampona transfer edilerek bir ve iki saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrüfüj edilerek uzaklaştırıldı ve süpernatant da serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0,05$

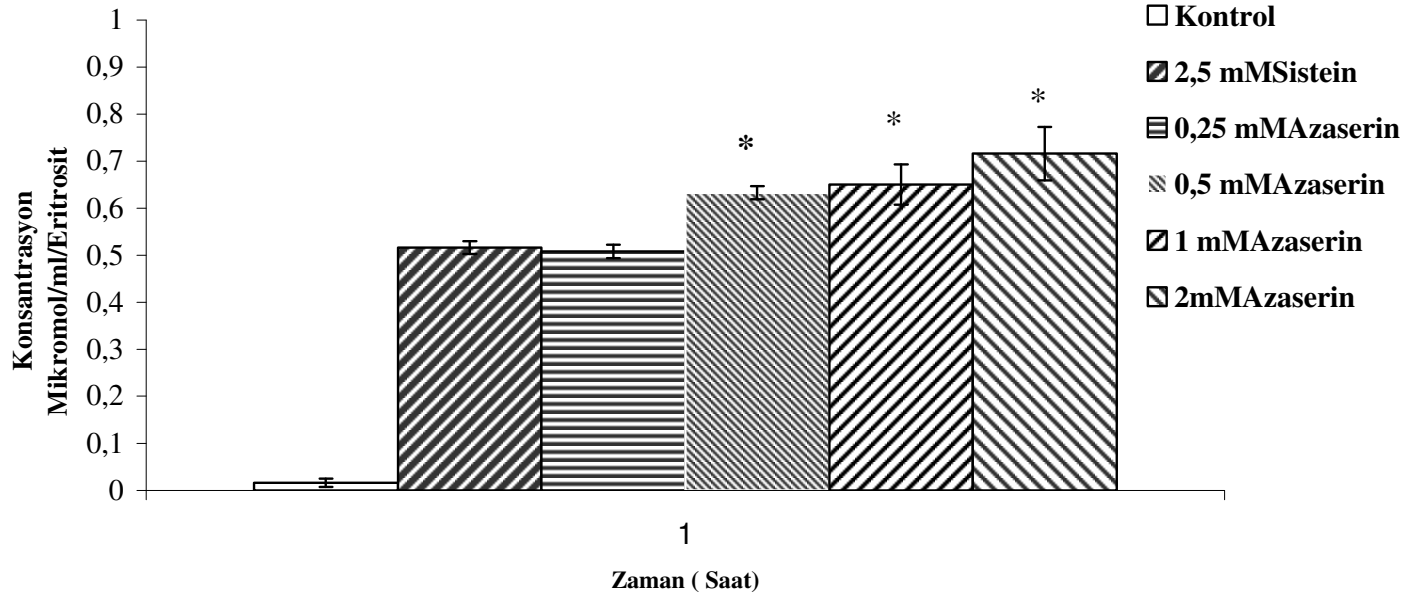
* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer



Şekil 4. 3. Sistein girişine azaserinin etkisi: Eritrositler 2,5 mM sistein ve farklı konsantrasyonlarda azaserin ile bir saat inkübe edildi. Eritrositler inkübasyon sonunuda yıkandı ve sonra eritrositlerde serbest -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0,05$

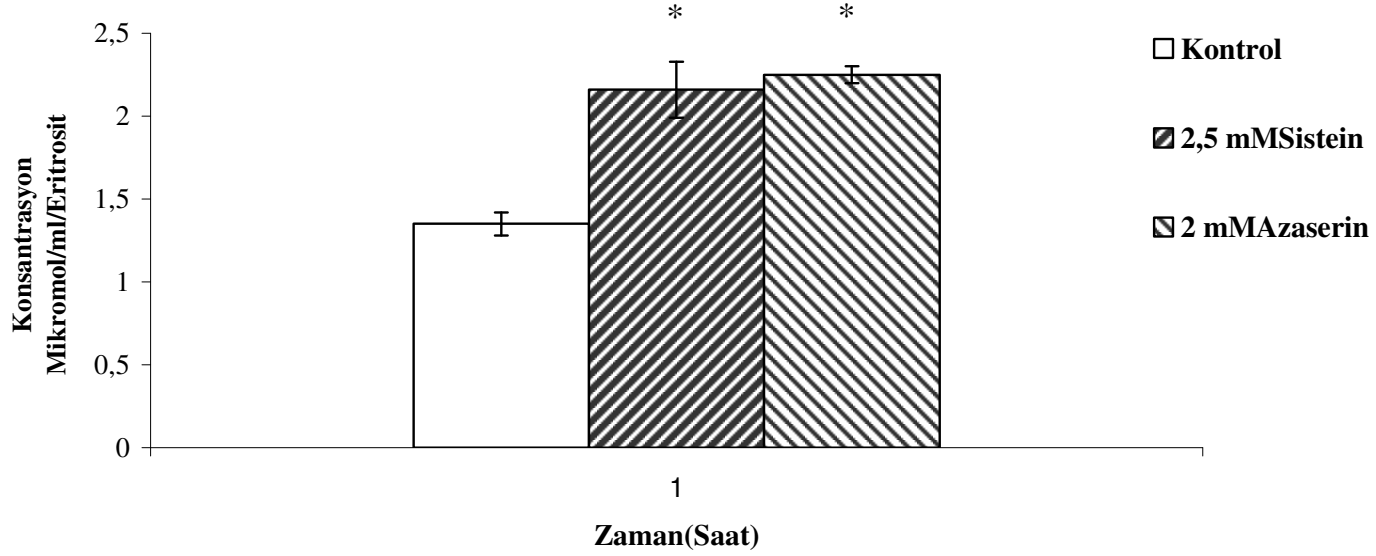
* 2,5 mM sistein grubundan önemli derecede farklı değer



Şekil 4. 4. Sistein çıkışına azaserinin etkisi: Kontrol grubu hariç bütün gruplar başlangıçta 2,5 mM sistein ile bir saat inkübe edildi. Eritrositler inkübasyon sonunda yıkandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Yıkanan eritrositler belirtilen düzeylerde azaserin içeren krebs tampona transfer edildi ve bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler uzaklaştırıldı ve supernatant da bulunan serbes -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0,05$

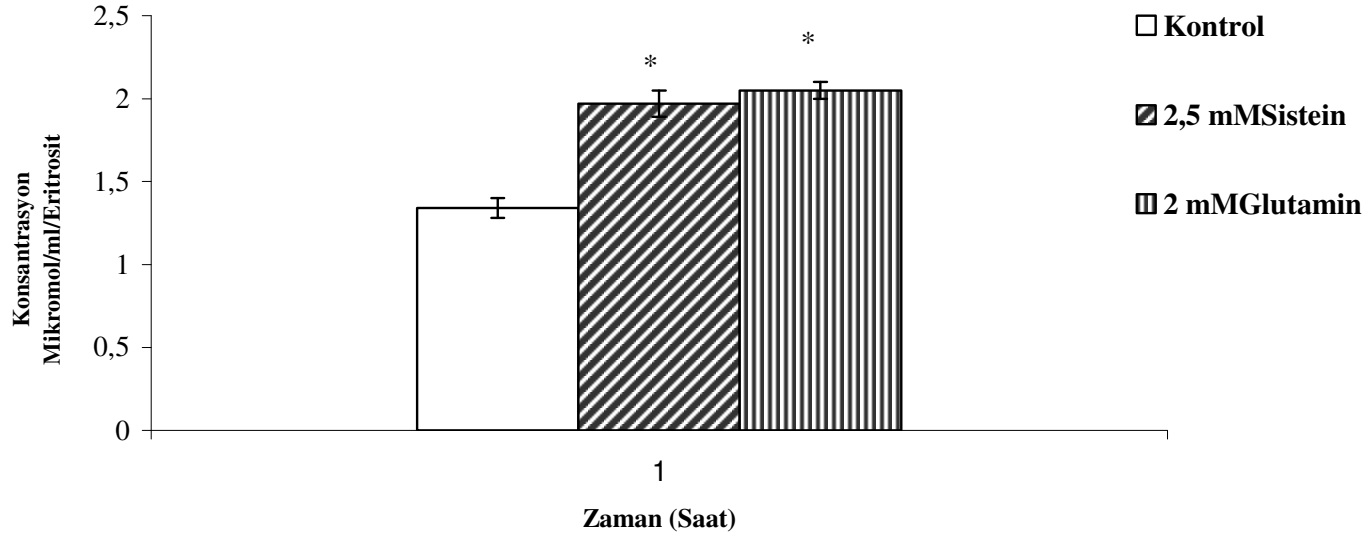
* Azaserin içermeyen gruptan önemli derecede farklı değer



Şekil 4. 5. Azaserinin sistein transportu üzerine geri dönüşümlü etkisi: Azaserin grubu başlangıçta 2 mM azaserinle beş saat süresince inkübe edildi. Diğer iki grup sadece krebs tamponla inkübe edildi. Eritrositler inkübasyon sonunda santrifüj edildi ve yıkandı. Yıkanan eritrositler kontrol grubu dışında 2,5 mM sistein içeren krebs tampona transfer edilerek bir saat inkübasyona bırakıldı. Eritrositler inkübasyon sonunda santrifüj edilerek yıkandı ve serbes -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

$p < 0,05$

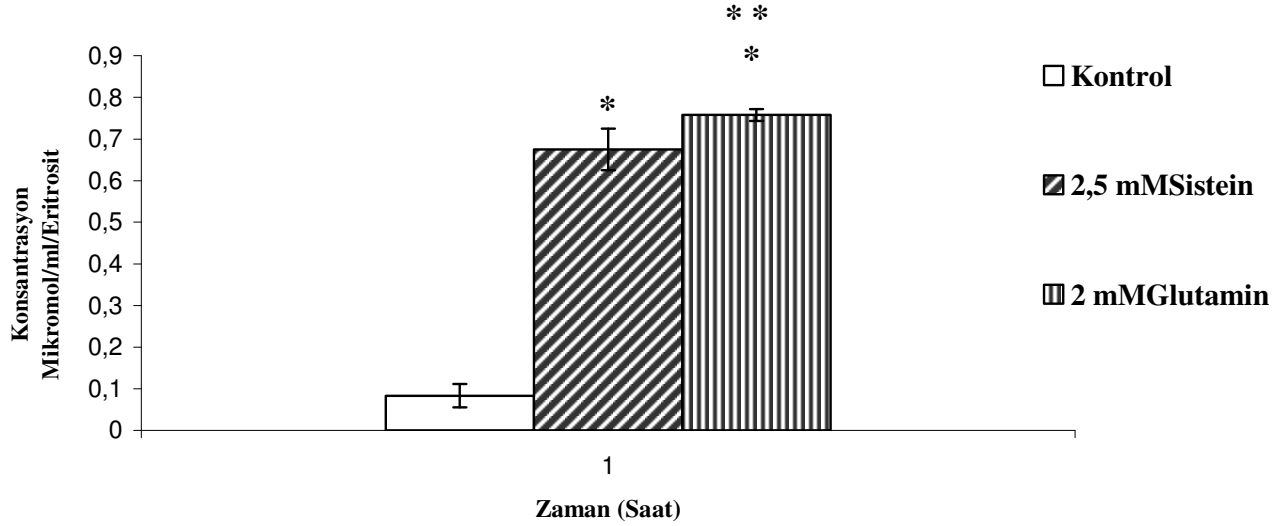
* Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı değer



Şekil.4. 6. Glutaminin sistein girişi üzerine etkisi: Eritrositler 2,5 mM sistein içeren krebs ringer içinde 2 mM glutamin varlığında ve yokluğunda bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler yıkanarak santrifüj edildi ve serbes -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verildi.

$p < 0,05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer.



Şekil.4. 7. Glutaminin eritrositlerden sistein çıkışı üzerine etkisi: Eritrositler kontrol grubu dışında diğer iki grup 2,5 mM sistein içeren krebs ringer içinde bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edilerek yıkandı ve eritrositler kontrol grubu ve sistein grubu temiz tampona diğer bir grup ise 2 mM glutamin içeren krebs ringer'e transfer edildi ve bir saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda eritrositler santrifüj edildi ve süpernatant da serbes -SH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar üç ayrı deneyin aritmetik ortalaması ve standart sapması olarak verildi.

$p < 0,05$

* Kontrol grubundan önemli derecede farklı değer.

** Glutamin içermeyen gruptan önemli derecede farklılık.

Tartışma Sonuç ve Öneriler

Sonuçlarımız eritrositlerin hücre dışı alandan sisteini aldıklarını ve sistein konsantrasyonu azaldığı zaman tekrar hücre dışı ortama sisteini geri verdiklerini göstermektedir. Eritrositlerin bu davranışları önceden tartışılmış olduğu gibi plazmada redoks bir durumunun düzenlenmesiyle ilişkili olabilir (Yıldız ve ark., 2005). Bu çalışmada, eritrositlerde sistein girişi ve çıkışı üzerine azaserinin etkisi araştırılmıştır.

Başlangıçta, azaserinin geri dönüşümsüz enzim inhibisyonuna neden olduğu gibi hücre membranında da belirli taşıyıcı proteinlerin aktivitelerinde geri dönüşümsüz herhangi bir değişim meydana getirip getirmediğinin cevabını aramaya çalıştık. Deneysel koşullardaki sonuçlarımız, azaserinin sistein taşınımında herhangi bir geri dönüşümsüz inhibisyon etkisi meydana getirmediğini göstermektedir. Bu nedenle, azaserinin sebep olduğu tümör oluşumunda membran transport mekanizmalarında geri dönüşümsüz bir değişim oluşturduğunu ileri süremeyiz.

Azaserin tümör oluşumuna sebep olan toksik bir bileşiktir. Azaserinin bu etkileri meydana getirmesi için hücreler içerisinde daha önceden birikmiş olması ya da ciddi bir konsantrasyona ulaşması gerekir. Bu hipotezi destekleyen birçok kanıt vardır. Prokaryotlarda azaserin aromatik amino asit taşıyıcıları tarafından alınır (Ames, 1964). Ayrıca *E. colide* azaserinin başka bir yapısal formu olan 6-diazo-5-oxo-L-norleucine alınımı aromatik amino asit taşıyıcıları tarafından gerçekleştirir (Williams, 1982). Bu taşıyıcılardaki eksiklik ya da mutasyon hücre içi azaserin varlığını sınırlamakta ve böylece jenerasyon azaserinle muamele edildiğinde direnç kazanmaktadır (Williams ve ark., 1980). Azaserinin D ve L izomerleri kullanılarak pankreasta yapılan çalışmalar, azaserin varlığındaki tümör oluşumunun tehdit edici olduğunu göstermiştir (Zurlo ve ark., 1981). Ancak azaserinin L-izomeri önemli derecede DNA hasarı ve pankreasta atipik asinar hücre nodüllerinin (AACN) oluşumuna neden olur. Bununla birlikte D-azaserin formu ne DNA hasarına nede sıçan pankreasında AACN oluşumuna neden olur.

Azaserin özellikle pankreasta tümör oluşumuna neden olur, çünkü pankreas hücreleri belirli bir mekanizmaya sahip olup diğer dokulara kıyasla çok yüksek azaserin konsantrasyonunu devam ettirirler.

Bu anlamda, pankreas hücreleri tarafından azaserinin hücre içerisine alınmasında ve hücrelerde toplanmasında sisteinin bir rolü olduğunu düşünmekteyiz. Azaserin bir amino asit analogudur ve bu yüzden bazı amino asitlerle benzer transport mekanizmalarını paylaşır. Bu taşıyıcı mekanizmalar genellikle ya iki farklı amino asidin hücrelere birlikte taşınımını ya da bir amino asit hücre içerisine alınırken başka bir amino asidin hücre dışına transportunun gerçekleştirilmesini sağlarlar. Bu taşıyıcı mekanizmalar gelişme ve çoğalma için gereksinim duyulan bütün amino asitlerin hücre içinde yüksek bir düzeyde tutulmasında işlev görürler. Önemli bir örnek, azaserinin hareketine bağlı olarak bakteri integral membran proteini YfiK aktivitesidir (Franke ve ark., 2003). Bu proteinin üretimi sistein ve O-asetilserinin paralel olarak salgılanmasıyla gerçekleşir. O-asetilserin bir azaserin analogu olup, bu proteinin ekspresyonu muhtemel olarak azaserin ve sisteinin birlikte dışarı atılmasında azaserine karşı direnç sağlar.

Bu çalışmadaki sonuçlarımız azaserin ve sisteinin birlikte transportundan daha çok ters yönde hareket ettiklerin göstermektedir. Eritrositler sistein ve azaserin ile birlikte inkübe edildiği zaman sistein girişinde hafif bir artış gözlenmiştir. Bununla beraber eritrositlerin trans tarafında başlangıçta azaserin varken hücreden dışarı sistein çıkışında önemli bir artış gözlenmiştir. Ayrıca azaserinin düşük konsantrasyonunda da aynı sonuçlar tespit edilmiştir. Önceki çalışmalardan elde edilen kanıtlar azaserin ve sistenin ters yönde transport edildiği hipotezini destekler. Bu çalışmada azaserinin analogu olan glutamin hücre dışı alanda sistein mevcutken hücrelerden dışarı atıldığı tespit edilmiştir (Broer ve ark., 1999). Azaserin pankreas dokularında özellikle tümör oluşumuna neden olur. Bu etkisi enzim inhibisyonuna ve DNA hasarına dayanır. Bununla beraber azaserinin özellikle neden pankreas dokularında tümör oluşturduğuna dahil hiçbir açıklama yoktur.

Bu araştırmadan elde edilene göre; azaserinin DNA hasarı ve enzimatik aktiviteleri inhibe edici faaliyetlerinden başka farklı şekillerde toplanmasını ihtiva eden dokularda tümör oluşturduğunu düşünmekteyiz. Azaserinle muamele edildiğinde tümör oluşturmayan dokular azaserini, sisteinle birlikte hücre dışına transport edebilir, bakteri YifK proteini de benzer bir aktiviteye sahiptir. Azaserinle muamele edildiğinde tümör meydana getiren dokular ise böylesi bir fonksiyondan yoksun olabilirler. Dokular azaserin/sistein değişim mekanizmalarıyla hücre içerisinde daha çok azaserini biriktirebilir ve hücrelerde azaserini ortamdan uzaklaştıran bir sistemin yokluğu

azaserinin tümör meydana getirmesinde etkili olabilir ya da azaserinin bu etkisini hızlandırabilir. Bu nedenle azaserinin neden olduğu tümör oluşumunda böylesi mekanizmaların fonksiyonlarının tanımlanması ve tespit edilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekir.

KAYNAKLAR

- Aaronson, S., 1959. Mode of Action of Azaserine on *Gaffkya Homari*. **J Bacteriol**, 77; 548–551.
- Ames, G. F., 1964. Uptake of amino acids by *Salmonella thyphimurim*. **Arc Biochem Biophys**, 104; 1–48.
- Armutcu, F., Gürel, A., Söğüt, S., Aksu, N., Ünalacak, M., 2004. Alkol Alışkanlığı Olanlarda Eritrosit Oksidan ve Antioksidan Parametre Düzeyleri. **Fırat Tıp Dergisi**, 9(2): 50–53.
- Albrecht, J., Sonnewald, U., Waagepetersen, S. H., ve Schousboe, A., 2007. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. **Frontiers in Bioscience**, 12; 332–343
- Bartz, Q. R., Elder, C. C., Frohardt, R. P., Haskel, T. H., Johannessen, D. W., Ryder, A., 1954. Azaserine a new tumor inhibitory substance-isolation and characterization of azaserine. **Nature**, 173: 74–75
- Bröer, A., Brookes, N., Ganapathy, V., Dimmer, K. S., Wagner, C. A., Lang, F., Bröer, S., 1999. The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. **Journal of Neurochemistry**. 73 (5); 2184–2194.
- Bender, S. A., Reichelt, W., Norenberg, D. M., 2000. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. **Neurochemistry International**, 37: 269–276.
- Coffey, G. L., Hillegas, A. B., Knudsen, M.P., Koepsell, H. J., Oyaas, J. E., Ehrlich, J., 1954. Azaserine: Microbiological studies. **Antibiotics and Chemotherapy**, 4: 775–791.
- Christensen, H. N., Oxender, D. L., Liang, M., Vatz, K. A., 1965. The Use of N-methylation to Direct Route of Mediated Transport of Amino Acids. **J.Biol. Chem**, 240; 3609–3616.
- Clarkson, P. M., 1995. Antioksidants ve Physical Performance. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, 35: 131–141
- Champe, C. P., Harvey, A. R., 1997. Lippincott Biyokimya.(A, TOKULLUĞİL, Editör). **Nobel Tıp Kitapevleri**, Bölüm-22, Amino Asitlerin Karbon İskeletlerinin Metabolizması, 243-256s, İstanbul.
- Conway, M., Chappel, S., 2000. Biyokimya-Olgu sunumlu yaklaşım. (N, Atlan, editör). **Palme Yayıncılık**, Bölüm-8, Amino Asitlerin Yıkımı ve Biyosentezi, 249-254s, Ankara
- Cases, N., Sureda, A. A., Maestre, I., Tauler, P., Aguiló, A., Cordova, A., Roche, E., Tur, A. J., Pons, A., 2006. Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes. **Eur. J. Appl Physiol**, 98; 263–269.
- Dawson, A. C., Widdas, W. F., 1963. Inhibition of glucose permeability of human erythrocytes by N-ethylmaleimide. **J. Physiol**, 168: 644–659.
- Dilliogluligil, O. M., Ilgazlı, A., Meral, H., Sengül, C., Ozdemir, G., Ercin, C., 2005. Protective Effects of N-acetylcysteine on the peroxidative changes of rat lungs exposed to inhalation of thinners. **Respirology**, 10: 615–619.
- Düzova, H., Emre, H. M., Karakoç, Y., Karabulut, B. A., Yılmaz, Z., Gürsul, C., Yologlu, S., 2006. Orta ve Yüksek Düzeyde Treadmill Egzersizinin

- Sıçanların Kas ve Eritrosit Oksidan/Antioksidan Sistemine Etkisi. **İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 13(1): 1-5.
- Eckert, K. G., Eyer, P., 1986. Formation and transport of xenobiotic glutathione –S-conjugates in red cells. **Biochemical Pharmacology**, 35(2); 325–329.
- Escobales, N., Figueroa, J., 1991. Na/Na Exchange and Na/H antiport in rabbit erythrocytes: two distinct transport systems. **Journal of Membrane Biology**. 120(1); 41–49.
- Franke, I., Resc, A., Dabler, T., Maier, T., Böck, A., 2003. YfiK from Escherichia coli promotes export of O-acetylserine and cysteine. **Journal of Bacteriology**. 185 (4); 1161–1166.
- Gots, S. J., Gollub, G. E., 1956. Purine Metabolism in Bacteria. IV. L-Azaserine as an inhibitor. **J.Bacteriol**, 72: 858–864.
- Guyton, A. C., 1986. Tıbbi Fizyoloji. (N. Gökhan, Editör). **Merk Yayıncılık**, Bölüm–4: Alyuvarlar Anemi ve polisitemi, 60-71s, İstanbul.
- Guidotti, G. G., Gazzola, G. C., 1992. Amino Acid Transporters: Systematics Approach and Principles of Control.(M.S.Kilberg ve D.Haussinger, Editör). In: Mammalian Amino Acid Transport Mechanisms and Control. Pg. 3–30, **New York**.
- Griffith, O. W., Mulcahy, R. T., 1999.The enzymes of glutathione biosynthesis: γ -glutamylcysteine synthetase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol**, 73: 209–267
- Griffith, O. W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, 27:922-935.
- Gültekin, F., Delibaş, N., Yaşar, S., Kılınç, I., 2001. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and Vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. **Arch Toxicol**, 75: 88–96.
- Gözükara, E. M., 2001. Biyokimya. **İ.Ü.Yayınları**, Malatya
- Gustafsson, C. A., Kupersmidt, I., Rose, E. E., Greco, G., Serafino, A., Kasnowska, A. E., Lundeberg, T., Laudiero, B. L., Romanco, C. M., Parasassi, T., Lundeberg, J., 2005. Global gene expression analysis in time series following N-acetyl-L-cysteine induced epithelial differentiation of human normal and cancer cells in vitro. **BMC cancer**, 5: 75.
- Henderson, F. J., Lepage, A. G., McIver, A. F., 1957. Observation on the Action of Azaserine in Mammalian Tissues. **Cancer Research**, 17: 609–612.
- Hruban, Z., Swift, H., Slesers, A., 1965. Effect of Azaserine on the fine Structure of the Liver and Pancreatic Acinar Cells. **Cancer Resh**, 25: 708–723.
- Hsu, L. Y., Marshall, M. C., Mcnamara, D. P., Segal, S., 1980. The effect of azaserine on glutamine uptake by renal brush-border membranes. **Biochem. J**, 192: 119–126
- Junqueira, C. L., Carneiro, J., Kelley, R.O., 1998. Temel Histoloji. (Y. AYTEKİN, Editör). **Barış Kitapevi**, Bölüm–12; Kan hücreleri, 221-241s, İstanbul.
- Jones, P. D., Mody, C. V., Carlson, L. J., Lynn, J. M., Sternberg, P., 2002. Redox Anaysis of Human Plasma allows Separation of Pro-Oxidant Events of Aging from decline in antioxidant defenses. **Free Radical Biology & Medicine**, 33; 1290–1300.

- Kalra, V. K., Sikka, S. C., Sethi, S. G., 1981. Transport of Amino Acid in γ -Glutamyl Transpeptidase-implanted Human Erythrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, 256; 5567–5571.
- Keppler, D., 1999. Export pumps for Glutathione S-Conjugates. **Free Radical Biology and Medicine**, 27; 985–991.
- Longnecker, D. S., Ve Curphey, T. J., 1975. Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine treated rats. *Cancer Res*, 35; 2249–2258.
- Longnecker, D. S., Roebeck, B. D., Yager, J. D., Lilja, H. S., Siegmund, B., 1981. Pancreatic Carcinoma In Azaserine-treated rats: Induction, Classification and Dietary Modulation of Incidence. **Cancer**, 47; 1562–1572.
-, 1984. Lesions induced in rodent pancreas by azaserine and other pancreatic carcinogens. **Environ. Healthperspect**, 56; 245–251.
- Lilja, S. H., Hyde, E., Longnecker, S. D., Yager, D. J., 1977. DNA Damage and Repair in Rat Tissues following Administration of Azaserine. **Cancer Res**, 37; 3925–3931.
- Lunn, G., Dale, G. L., Beutler, E., 1979. Transport accounts for glutathione turnover in human erythrocytes. **Blood**, 54; 238–244.
- Levy, R., Lijne, A., 1984. Erythrocyte Li-Na countertransport system. Inhibition by N-ethylmaleimide probes for a conformational change of the transport system. **Biochim. Biophys. Acta**, 777 (2); 157–166.
- Lhoste, E.F., Roebuck, B. D., Stern, J. E., Longnecker, D. S., 1987. Effect of orchietomy and testosterone on the early stages of azaserine-induced pancreatic carcinogenesis in the rat. **Pancreas**, 2(1); 38-43.
- Lyons, D. S., Sant, E. M., Christopherson, I. R., 1990. Cytotoxic Mechanisms of Glutamine Antagonists in Mouse L1210 Leukemia. **The Journal of Biological Chemistry**, 265; 11377–11381.
- Low, S. Y., Taylor, P. M., Ahmed, A., Pogson, C. I., Rennie, M. J., 1991. Substrate-specificity of glutamine transporters in membrane vesicles from rat liver and skeletal muscle investigated using amino acid analogues. **Biochem Journal**, 278(Pt1); 41–49.
- Lu, C. S., Sun, M. W., Yi, J., Ookhtens, M., Sze, G., Kaplitz, N., 1996. Role of two recently cloned rat liver GSH transporters in the ubiquitous transport of GSH in mammalian cells. **J. Clin. Invest**, 97; 1488–1496.
- Lehninger, A. L., Nelson, D.L., Cox, M. M., 2005. Principles of Biochemistry. **Worth Publishers**, Chapter–11; Biological Membranes and Transport, 370–378s, New York.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., 1991. Biosynthesis of nutritionally nonessential amino acids. Harper's Biochemistry, 22nd Ed. **Appleton & Lange**, 267–269 USA.
-, 1996 Harper'in Biyokimyası. (DİKMEN, N, Editör). **Bariş Kitapevi**, Bölüm–6, Zenobiyotiklerin metabolizması, 807-832s, İstanbul.
- Mathews, C. K., Holde, K. E. V., 1996. **Biochemistry**, The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Second Edition. Lipids, Membranes and Cellular Transport, 10; 331-334.
- Mcbean, G. J., Flynn, J., 2001. Molecular mechanism of cystine transport. **Biochemical Society Transactions**, 29(6); 717–722.

- Milan, G. C., Marinero, S. L. M., Castaneda, Z. A., Lanao, M. J., 2004. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. **Journal of Controlled Release**, 95; 27–49.
- Noyan, A., 2000. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, **Meteksan**, Bölüm-1; Hücre, 1-29s, Ankara.
- Ohtsuka, Y., Kondot, T., Kawakami, Y., 1992. Oxidative stresses induced the cystine transport activity in human erythrocytes. **Biochemical and Biophysical research communications**, 155: 160–166.
- Olive, C., Board, P., 1994. Glutathione S-conjugate Transport of cultured by human Cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1224; 264–268.
- O’driscoll, M., Macpherson, P., Xu, Y. Z., Karran, P., 1999. The cytotoxicity of DNA carboxymethylation and methylation by the model carboxymethylating agent azaserine in human cells. **Carcinogenesis**, 20 (9); 1855–1862.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y., 2002. İnsan Biyokimyası. **Palme yayıncılık**, Bölüm-1-4; Hücre, Amino Asitlerin Metabolizması, 1-18s, 80-104s, Ankara.
- Öztaş, H., 1993. The modulation of exocrine pancreatic carcinogenesis, a quantitative stereological and electron microscope study. **Universty of Bristol**.
 , 2000. Hücre Biyolojisi(sitoloji). **Bakanlar Media**, Bölüm-7; Ökaryotik Hücreler, 72-85s, Erzurum.
- Perantoni, A., Rice, J. M., Nardone, R. M., Berman, J. J., Curphey, T. J., 1984. The function of gamma-glutamyl transpeptidase as a determinant in cell sensitivity to azaserine toxicity. **Chem Biol Interact**, 52(1): 39-50.
- Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A., 1998. Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. **Physiol. Rev**, 78: 969–1054.
- Roebuck, B. D., 1986. Effects of High Levels of Dietary Fats on the Growth of azaserine-induced Foci in Rat Pancreas. **Lipids**, 21: 281–284.
- Robbins, L. S., Kumar, V., 1987. Temel Patoloji.(Ö, Uluoğlu, editör). **Güneş Kitapevi**, Bölüm-1, Hücre Zedelenmesi ve Adaptasyon, 1-32s Ankara.
- Ruiz, E., Siow, M. C. R., Bartlett, R. S., Jenner, M. A., Sato, H., Bannal, S., Vemann, E. G., 2002. Vitamin C Inhibits Diethylmaleate-Induced L-Cystine Transport in Human Vascular Smooth Muscle Cells. **Free Radical Biology & Medicine**, 34: 103–110.
- Stock, C.C., Reilly, H. C., Buckley, S. M., Clarke, D. A., Rhoads, C. P., 1954. Azaserine a new tumor inhibiting substance: Studies with crockermouse sarcoma 180. **Nature**, 173: 71-73.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H., 1968. Determination of Sulfhydryl Groups in Biological Samples. **Analytical Biochemistry**, 25: 192–205.
- Srivastava, K. S., Beutler, E., 1970. Glutathione Metabolism of the Erythrocyte. **Biochem. J**, 119: 353–357.
- Smith, E. L., Hill, R. L., Lehman, I. R., Lefkowitz, R. J., Handler, P., White, A., 1983. Metabolism of purine and pyrimidine nucleotides, Principals of Biochemistry 7th Ed. **McGraw-Hill Comp**, 672-675. USA.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, 27: 916–921.
- Sağlam, M., Asti, R. N., Ozer, A., 2001. Genel Histoloji. **Yorum Matbaacılık**. Bölüm-6; Kan Dokusu, 209-241s Ankara.

- Schousboe, A., 2007. Glutamine in the Central Nervous System: Function and Dysfunction. **Frontiers in Bioscience**, 12; 332–343.
- Şimşek, E., 1994. Biyokimya. **Güneş Kitapevi**. Bölüm–2; Hücre, 5-16s, Ankara.
- Ulakoglu, E. Z., Gümüştas, M. K., Belce, A., Altug, T., Kokoglu, E., 1998. Strese Bağlı Mide Mukozası Hasarında Endojen Glutasyon Tükenişinin Enerji Metabolizması ile İlişkisi. **Cerahpaşa J.Med**, 29(3); 127–131.
- Uslu, C., 2006. Eritrositlerde L-sistein Amino Asit Exportuna Hücre İçi ve Dışı Redoks Durumunun Etkisi. **Yüksek Lisans Tezi**. Mustafa Kemal Üniversitesi, Antakya.
- Vries, N. D., Flora, S. D., 1993. N-Acetyl-L-Cysteine. **Journal of Cellular Biochemistry, Supplement** 17F; 270–277.
- Voet, D., Voet, G. J., 1995. Biochemistry. **Von Hoffman Press**. Chapter–24, Amino Acid Metabolism, 727-776s, New York.
- Yıldız, D., Ateş, H. B., Uslu, C., Öztas, H., 2005. L-Cysteine influx and efflux in Human Erythrocytes: the role of Red Blood Cells in Redox and Metabolite Homeostasis in the Plasma. **Journal of Health Science**, 52(2); 118–123.
-, Uslu, C., Çakır, Y., Öztaş, H., 2006. L-Cysteine influx and efflux: A possible role for red blood cells in regulation of redox status of the plasma. **Free Radical Research**, 40(5); 507-512.
- Yang, S. M., Chan, W. H., Yu, C. L., 2006. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. **Toxicology**, 226: 126–130.
- Zurlo, J., Longnecker, D. S., Cooney, D. A., Kuhlmann, E. T., Curphey, T. J., 1981. Studies of pancreatic nodule induction and DNA damage by D-azaserine. **Cancer Letters**. 12 (1–2); 75–80
- Zhang, S. M., Willett, C. W., Sehub, J., Manson, J. E., Colditz, G. A., Hankinson, S.E., 2003. A prospective study of plasma total cysteine and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 12; 1188–1193.
- Williams, M. W., Kerr, T. J., Lemmon, R. D., Tritz, G. J., 1980. Azaserine resistance in *Escherichia coli*: chromosomal location of multiple genes. **Journal of Bacteriology**, 43(1); 383–388.
-, 1982. Transport mechanisms of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine in *Escherichia coli* K-12. *Microbiologica*. 5(1); 57–61
- Wegrzynowicz, M., Hilgier, W., Dybel, A., Oja, S. S., 2007. Upregulation of cerebral cortical glutathione synthesis by ammonia in vivo and in cultured glial cells: The role of cystine uptake. **Neurochemistry International**, 75: 1s
- Wu, G., Haynes, T. E., Meininger, C. I., 2000. Glutamine metabolism in endothelial cells: ornithine synthesis from glutamine via pyrroline-5-carboxylate. **Comp. Biochem Physiol. A Mol Integr. Physiol**, 126(1); 115-23.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen değerli danıőman hocalarım Sayın Deniz YILDIZ (M.K.Ü Fen-Ed Fak. Biyoloji Bölümü) ve Prof. Dr. Haydar ÖZTAŞ'a (Selçuk Üniversitesi Eğitim Fak), bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sayın Doç.Dr Nizami DURAN, Doç.Dr. Sadık SÖGÜT ve Uz. Dr Burçin ÖZER'e (M.K.Ü Tıp Fakültesi), tüm çalıőmam süresince bana destek olan Arő. Gör. Hasan YILDIZ'a, Yeliz ÇAKIR'a, Bektaő SÖNMEZ'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma içten teőekkürü borç bilirim.

Ayrıca hayatımın her evresinde benden maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen fedakâr aileme gönül dolusu teőekkürleri sunmayı borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Çorum'un Alaca ilçesine bağlı Tutluca Köyünde doğdum. İlköğrenimimi köy ilkokulunda, orta ve lise öğrenimimi ise Alaca da tamamladım. 2004 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Fen-Edebiyat Fakültesi birincisi olarak mezun oldum. 2005 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümünde yüksek lisans eğitimime başladım.